

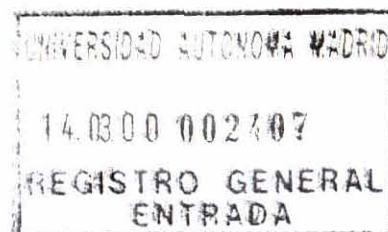
B

FL/C/2007

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

**Bases Moleculares de la Resistencia Múltiple a
Antibióticos de *Stenotrophomonas maltophilia***

TESIS DOCTORAL



Ana María Alonso Santos

Centro Nacional de Biotecnología
Madrid, 2000



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular

Bases Moleculares de la Resistencia Múltiple a Antibióticos de
Stenotrophomonas maltophilia

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por:

Ana María Alonso Santos

Director: Dr. José Luis Martínez Menéndez

Titulado Superior del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

Tutor: Dr. Ricardo Amils Pibernat

Catedrático de la Universidad Autónoma de Madrid

Agradecimientos

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biotecnología Microbiana del Centro Nacional de Biotecnología del C.S.I.C.

Deseo expresar mi agradecimiento al Dr. José Luis Martínez, director de esta tesis, por cuatro años de ayuda constante, multitud de ideas y una casi eterna paciencia.

Al Dr. Ricardo Amils por haber aceptado ser tutor de esta tesis.

Al Dr. Ignacio Alós del Hospital de Móstoles por cedernos las cepas de *S. maltophilia*, sin las cuales este trabajo no hubiera podido llevarse a cabo.

Al Servicio de Proteómica del CNB y a Antonio Varas, del Servicio de Secuenciación del CNB, por su inestimable colaboración.

Al Servicio de Animalario del CNB.

Al Gobierno Vasco por la ayuda económica, imprescindible para mi supervivencia durante todo este tiempo.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Listado de las Tablas	2
Listados de las Figuras	3
1 Introducción	5
1.1 Características generales de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	5
1.1.1 Hábitat natural	5
1.1.2 Fenotipo de resistencia	6
1.1.3 Importancia como patógeno oportunista	7
1.2 Origen y diseminación de la resistencia a antibióticos	9
1.3 Mecanismos de resistencia basados en el transporte de antibióticos	9
1.3.1 Envoltura celular	9
1.3.2 Sistemas de bombeo de drogas	11
1.3.2.1 Clasificación transportadores	11
1.3.2.2 Ubicuidad de los sistemas de bombeo de drogas	12
1.4. Sistemas de bombeo RND en bacterias Gram-negativas	14
1.4.1 Componentes estructurales	15
1.4.2 Descripción de los sistemas más estudiados. Organización génica	16
1.4.2.1 Sistemas Acr de <i>Escherichia coli</i>	17
1.4.2.2 Sistemas Mex de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18
1.4.2.3 Sistema Mtr en <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	19
1.4.3 Sustrato naturales	20
1.5. Coste asociado al fenotipo de resistencia	21
2. Objetivos	24
3. Materiales y Métodos	25
3.1 Materiales	25
3.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos	25
3.1.2 Medios de cultivo	27
3.1.3 Soluciones de antibióticos	27
3.1.4 Soluciones y tampones	28
3.2 Métodos	29

3.2.1 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas	29
3.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	29
3.2.2 Ensayos de acumulación intracelular	29
3.2.2.1 Tetraciclina	30
3.2.2.2 Quinolonas	30
3.2.2.3 Bromuro de Etidio	31
3.2.3 Fraccionamiento subcelular	31
3.2.4 Análisis de proteínas	31
3.2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)	31
3.2.4.2 Electroforesis bidimensionales	31
3.2.4.3 Transferencia de Western	32
3.2.4.4 Análisis por espectrometría de masas de los fragmentos generados por digestión trípica de Omp54	32
3.2.5 Producción de suero policlonal anti-Omp54	32
3.2.6 Purificación de ácidos nucleicos	33
3.2.6.1 Preparación de ADN cromosómico	33
3.2.6.2 Preparación de ADN plasmídico	33
3.2.6.3 Preparación de ARN	33
3.2.7 Electroforesis en geles de agarosa	33
3.2.8 Manipulación de ácidos nucleicos	34
3.2.8.1 Digestión enzimática	34
3.2.8.2 Ligación de fragmentos de restricción	34
3.2.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
3.2.8.4 Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)	34
3.2.9 Construcción de genotecas <i>S. maltophilia</i> D457R	35
3.2.9.1 Estrategia de ligación	35
3.2.9.2 Empaquetamiento en el bacteriófago λ	36
3.2.9.3 Infección en <i>E. coli</i>	36
3.2.10 Transducción con fagos P1	36
3.2.11 Transformación	37
3.2.12 Movilización de cósmidos	37
3.2.13 Secuenciación del ADN	37
3.2.14 Análisis de las secuencias	37
3.2.15 Hibridación con sondas de ADN	39

3.2.15.1 Transferencia de Southern	39
3.2.15.2 Transferencia de Northern	39
3.2.15.3 Marcaje radioactivo de sondas de ADN	40
3.2.15.4 Hibridación	40
3.2.16 Determinación del tamaño celular	40
3.2.16.1 Observación al microscopio	40
3.2.16.2 Distribución de tamaños con el contador y canalizador de Coutler	40
3.2.17 Cuantificación ATP y ADP	41
4. Resultados	43
4.1 Obtención de <i>S. maltophilia</i> D457R	43
4.1.1 Fenotipo de multirresistencia	43
4.1.2 Expresión de una nueva proteína en la membrana externa de <i>S.</i> <i>maltophilia</i> D457R	45
4.1.3 Acumulación intracelular de [³ H]tetraciclina, quinolonas y bromuro de etidio en <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R	45
4.2 Obtención de un anticuerpo policlonal contra Omp54	50
4.3 Clonaje de un determinante de resistencia a eritromicina a partir de <i>S.</i> <i>maltophilia</i> D457R	51
4.3.1 <i>mphBM</i>	52
4.3.2 <i>bin3</i>	52
4.3.3 <i>cadC</i> y <i>cadA</i>	54
4.3.4 IS257	54
4.3.5. La agrupación de genes presentes en pERY se encuentra en el cromosoma de <i>S. maltophilia</i> D457R	54
4.4 Clonaje de un sistema de eflujo a partir de <i>S. maltophilia</i> D457R	55
4.4.1 pAS1 confiere resistencia múltiple a antibióticos	56
4.4.2 pAS1 codifica una proteína de membrana externa inmunoreactiva a anti-Omp54	56
4.5 Subclonaje y secuenciación del determinante de multirresistencia clonado a partir de <i>S. maltophilia</i> D457R	57
4.5.1 Cósmido pAS1	57
4.5.2 pUCE2	60

4.6 Análisis comparativo de la secuencia de amino ácidos de las proteínas SmeD, SmeE y SmeF	62
4.6.1 ORF 1 (SmeD)	62
4.6.2 ORF 2 (SmeE)	64
4.6.3 ORF 3 (SmeF)	67
4.7 SmeF y Omp54 son la misma proteína	68
4.8 Estudio funcional del operón <i>smeDEF</i> expresado en <i>E. coli</i>	69
4.8.1 Fenotipo de multirresistencia	70
4.8.2 Acumulación intracelular de norfloxacin y bromuro de etidio	70
4.9 Expresión del operón <i>smeDEF</i> a lo largo del crecimiento de <i>S. maltophilia</i>	72
4.9.1 SmeF	72
4.9.2 <i>smeDEF</i>	72
4.10 Clonaje de un regulador potencial del sistema <i>smeDEF</i>	75
4.10.1 Análisis comparativo de la secuencia SmeT	76
4.11 Comparación de las secuencias de los genes <i>smeT</i> de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R	79
4.12 Estudio de la expresión de <i>smeDEF</i> en aislados clínicos de <i>S. maltophilia</i>	79
4.12.1 La expresión de SmeF está asociado al fenotipo de multirresistencia tanto en mutantes obtenidos <i>in vitro</i> como en aislados clínicos	80
4.12.2 Acumulación intracelular de quinolonas	83
4.12.3 RT-PCR	85
4.13 Caracterización fisiológica: coste asociado al fenotipo de multirresistencia	85
4.13.1 Estudio preliminar: tiempo de generación, tamaño de colonia y ufc/colonia	85
4.13.2 Tamaño celular	87
4.13.3 Ensayos de competición	89
4.13.4 Estado energético	90
4.14. Análisis de los proteomas de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R	93
5. Discusión	95
6. Conclusiones	105
7. Referencias Bibliográficas	107
Anexo I: Secuencia ERY1 de <i>S. maltophilia</i> D457R (Número de acceso EMBL: AJ251015).	126

Anexo II: Secuencia *smeDEF* de *S. maltophilia* D457R (Número de acceso EMBL: AJ252200).

Anexo III: Secuencia *smeT* de *S. maltophilia* D457R. **134**

Abreviaturas

aa	aminoácidos
ABC	zona de unión a ATP (ATP binding cassette)
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNasa	desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario
ADP	adenosín difosfato
AMP	adenosín monofosfato
AMV-RT	retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar
(α - ³² P)dATP	desoxiadenosina trifosfato marcado con ³² P en la posición α
ARN	ácido ribonucleico
ARNasa	ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ARNr	ARN ribosómico
ATP	adenosín trifosfato
BrEt	bromusro de etidio
CCCC	carbonil cianuro <i>m</i> -clorofenil hidrazona
Ci	curios
CMI	concentración mínima inhibitoria
cpm	cuentas por minuto
dATP	desoxiadenosina trifosfato
dCTP	desoxicitosina trifosfato
dGTP	desoxiaguanina trifosfato
Da	dalton
DMSO	dimetil sulfóxido
D.O.	densidad óptica
dTTP	desoxitimidina trifosfato
EDTA	ácido etilendinitrilotetraacético
HTH	hélice-giro-hélice (helix-turn-helix)
IPTG	isopropil-b-D-tiogalactopiranósido
LPS	lipopolisacárido
MFP	membrane fusion proteins
MFS	Major facilitator superfamily
MOPS	ácido 3N-(morfolino)-propano-sulfónico
OMF	factor de membrana externa (outer membrane factor)
Omp	proteína de membrana externa (outer membrane protein)
ORF	pauta abierta de lectura (open reading frame)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction)
RND	resistencia, nodulación y división celular (resistance nodulation cell division)
SDS	dodecil sulfato sódico
SMR	resistencia múltiple a drogas de <i>Estafilococos</i> (<i>Staphylococcal</i> (o <i>small</i>) multidrug resistance)
TMS	segmentos que atraviesan la membrana (transmembrane segments)
Tris	tris hidroximetil aminometano
UV	ultra violeta

Listado de Tablas

Tabla 1	Transportadores de sistemas de bombeo de drogas dependientes de la fuerza motriz de protones en organismos eucariotas y procariotas.	13
Tabla 2	Cepas de <i>S. maltophilia</i> y <i>E. coli</i> empleadas en éste trabajo.	25
Tabla 3	Plásmidos utilizados a lo largo del trabajo.	26
Tabla 4	Oligonucleótidos empleados a lo largo de éste trabajo.	38
Tabla 5	Valores de CMIs de diversos compuestos para cepas de <i>S. maltophilia</i> y <i>E. coli</i> .	44
Tabla 6	Comparación de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de restricción <i>Pst</i> I de pUCE2 con secuencias de la base de datos EMBL.	60
Tabla 7	Características generales de las ORFs secuenciadas a partir de la construcción pUCE2.	62
Tabla 8	Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeD con proteínas de la familia MFP (membrane fusion protein).	63
Tabla 9	Motivo péptido señal precursor de lipoproteínas identificado en SmeD.	63
Tabla 10	Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeE con proteínas de la familia RND (resistance nodulation cell division).	64
Tabla 11	Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeF con proteínas de la familia OMF (outer membrane factor).	67
Tabla 12	Motivo péptido señal precursor de lipoproteínas identificado en SmeF.	67
Tabla 13	Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeT con proteínas de la subfamilia TetR.	77
Tabla 14	Comparación de las secuencias de <i>smeT</i> de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	79
Tabla 15	Determinación de ufc/colonia en <i>S. maltophilia</i> D457 D457R, R2, R3, R4 y R5.	87

Listado de Figuras

Figura 1	Diagrama de la estructura de los sistemas de eflujo de drogas en Gram-positivos y Gram-negativos.	15
Figura 2	Organización génica de los sistemas de bombeo RND.	17
Figura 3	Análisis electroforético de proteínas de membrana externa de <i>S. maltophilia</i> D457 y su derivado multirresistente D457R.	45
Figura 4	Acumulación intracelular de [³ H]tetraciclina y quinolonas en <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	47
Figura 5	Acumulación intracelular de bromuro de etidio en <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	49
Figura 6	Análisis de la especificidad del suero policlonal anti-Omp54.	50
Figura 7	Organización génica de la región ERY1 clonada a partir de ADN cromosómico de <i>S. maltophilia</i> de D457R.	53
Figura 8	Amplificación mediante PCR de una región interna del gen <i>mphBM</i> a partir de ADN cromosómico de <i>S. maltophilia</i> D457R.	55
Figura 9	Inmunodetección de Omp54 en cepas de <i>E. coli</i> que contienen el cósmido pAS1 de la genoteca ADN cromosómico <i>S. maltophilia</i> D457R.	57
Figura 10	Análisis electroforético de los fragmentos de restricción pAS1.	58
Figura 11	Organización génica y mapa de restricción del inserto de 30 kpb contenido en el cósmido recombinante pAS1.	59
Figura 12	Análisis de las fases de lectura abierta (ORFs) de la secuencia de ADN de <i>S. maltophilia</i> D457R clonada en la construcción pUCE2.	61
Figura 13	Análisis del índice de hidropatía de SmeE.	66
Figura 14	Comparación de los fragmentos trípticos de Omp54 y los deducidos a partir de la secuencia de SmeF.	68
Figura 15	Inmunodetección de SmeF en una cepa de <i>E. coli</i> AA72 que contiene la construcción pAS2.	69
Figura 16	Acumulación intracelular de bromuro de etidio y norfloxacin en <i>E. coli</i> (pAS2).	71

Figura 17	Análisis de la expresión de SmeF a lo largo de las curvas de crecimiento de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	73
Figura 18	Análisis transcripcional de la expresión del operón <i>smeDEF</i> a lo largo de las curvas de crecimiento de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	74
Figura 19	Clonaje del regulador del sistema <i>smeDEF</i> .	75
Figura 20	Alineamiento múltiple de la secuencias aminoacídicas de SmeT y de proteínas reguladoras de la subfamilia TetR.	78
Figura 21	Análisis de la expresión de <i>smeDEF</i> en aislados clínicos de <i>S. maltophilia</i> .	80
Figura 22	Análisis de la expresión de SmeF en mutantes de <i>S. maltophilia</i> obtenidos por presión antibiótica.	81
Figura 23	Análisis de la expresión de SmeF en aislados clínicos de <i>S. maltophilia</i> .	82
Figura 24	Acumulación intracelular de quinolonas en aislados clínicos de <i>S. maltophilia</i> .	85
Figura 25	Aspecto de las colonias de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	86
Figura 26	Morfología celular de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	88
Figura 27	Seguimiento del volumen celular relativo a lo largo de las curvas de crecimiento de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	89
Figura 28	Ensayos de competición en medio líquido LB entre <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	91
Figura 29	Concentración de ATP y ADP en cultivos exponenciales y estacionarios de <i>S. maltophilia</i> D457 y D457R.	92
Figura 30	Análisis de los proteomas de <i>S. maltophilia</i> D457 Y D457R.	94
Figura 31	Organización génica de los sistemas de bombeo RND, incluyendo <i>smeTsmeDEF</i> de <i>S. maltophilia</i> .	101

1 Introducción

1.1 Características generales de *Stenotrophomonas maltophilia*

El género *Stenotrophomonas* fue propuesto en 1993 por Palleroni y Bradbury (Palleroni y Bradbury, 1993) tras varios años de confusión en la posición taxonómica de la bacteria Gram-negativa *S. maltophilia*. El microorganismo tipo fue aislado en 1958 a partir de una muestra orofaríngea de un paciente con carcinoma oral y fue tipificado como *Pseudomonas maltophilia* (Hugh y Leifson, 1963). Las células de *S. maltophilia* tienen forma bacilar y son aerobios obligados siendo la temperatura óptima de crecimiento 35°C. Presentan flagelos polares y no acumulan poly- β -hidroxibutirato. En medio sólido forman colonias uniformes y de color amarillo claro (Krieg, 1984). A lo largo de los años, se han incluido diversos aislados de origen clínico y ambiental (revisado en (Denton y Kerr, 1998)). Posteriormente, el análisis de hibridación ADN-ARN ribosómico mostró la presencia de 5 grupos según la homología de los ARNr en el género *Pseudomonas* y se vio que los cistrones ARNr de *P. maltophilia* eran más similares al género *Xanthomonas* que a *Pseudomonas* (Palleroni y cols., 1973). Basándose en los resultados del análisis de hibridación ADN-ARNr, Swing y cols. propusieron en 1981 la reclasificación de *P. maltophilia* dentro del género *Xanthomonas* como *X. maltophilia*. Aportaron una serie de evidencias de la relación cercana entre el género *Xanthomonas* y *P. maltophilia*: contenido G+C parecido, composición de ácidos grasos similar, ausencia de dehidrogenasas dependientes de NADH y producción de ubiquinonas similares (Swings y cols., 1983). Este cambio taxonómico no fue aceptado de forma universal debido a que las características aportadas por Swing y cols. no están restringidas al género *Xanthomonas*. Posteriormente, en 1993 Maes detectó diferencias en los productos de PCR entre *X. maltophilia* y las demás especies del género *Xanthomonas* al emplear oligonucleótidos específicos del ARN 16S de *Xanthomonas* (Maes, 1993). En ese mismo año, se intentó solucionar este problema taxonómico con la creación del género *Stenotrophomonas* siendo en aquel momento su único miembro la especie *S. maltophilia*. Recientemente, Drancourt y cols. han propuesto a *S. africana*, un patógeno humano oportunista aislado en África, como segundo miembro del género *Stenotrophomonas* (Drancourt y cols., 1997).

1.1.1 Hábitat natural

La especie *S. maltophilia* se encuentra ampliamente distribuida en la Naturaleza y se ha aislado tanto de muestras clínicas como de muestras ambientales (revisado por (Denton y Kerr, 1998)). Su hábitat natural es el suelo asociado a las raíces de plantas (rizosfera). En este microambiente *S. maltophilia* es capaz de promover el crecimiento de las plantas y de protegerlas de la acción de hongos. Se ha descrito que produce un antifúngico lactámico macrocíclico, maltofilina (Jakobi y cols., 1996). De hecho, se ha comprobado que inhibe el

crecimiento de hongos patógenos de humanos como *Candida* spp. y *Aspergillus fumigatus* (Kerr, 1996). Las rizobacterias, incluyendo a *S. maltophilia*, tienen que protegerse de sus propios antibióticos y de los producidos por otras rizobacterias por medio de mecanismos de resistencia para poder sobrevivir y competir en el ambiente rico en nutrientes propio de la rizosfera.

1.1.2 Fenotipo de resistencia

Una de las características más importantes de *S. maltophilia*, tanto de aislados de origen clínico como de origen ambiental, es su resistencia intrínseca a antibióticos de diversas clases (Berg y cols., 1999; Hancock, 1998; Penzak y Abate, 1997). De hecho, los medios selectivos para aislar *S. maltophilia* de distintas fuentes contienen diversos antibacterianos. Un ejemplo es el medio desarrollado por Juhnke y Des Jardins (Juhnke y des Jardin, 1989) para aislar *S. maltophilia* de muestras de suelo. El medio contiene 6 agentes antimicrobianos y 2 antifúngicos. Recientemente se ha realizado un estudio con aislados de origen clínico y ambiental en el que se observa que el patrón de resistencia a diversos antibióticos no está relacionado con el origen (clínico/ambiental) (Berg y cols., 1999). Lo que sugiere que las cepas de origen clínico de *S. maltophilia* no han adquirido un fenotipo de resistencia durante el tratamiento antibiótico. Sin embargo, actualmente existe una controversia en relación al origen del fenotipo de multirresistencia adquirida. En este sentido, diversos trabajos apuntan a que, independientemente de su resistencia intrínseca, los aislados post-terapia antibiótica de *S. maltophilia* desarrollan una mayor resistencia a agentes antimicrobianos (Vartivarian y cols., 1994; Garrison y cols., 1996).

El estudio de los mecanismos de resistencia de *S. maltophilia* es reciente comparado con la información existente de mecanismos de resistencia de otros microorganismos. Se han caracterizado dos β -lactamasas cromosómicas (L1 y L2) que confieren resistencia a diversos β -lactámicos y a combinaciones de β -lactámicos/inhibidores de β -lactamasas (Walsh y cols., 1994; Walsh y cols., 1997). La β -lactamasa L1, producida por todas las cepas analizadas, es dependiente de Zn^{2+} y la forma funcional tetrámera (Ullah y cols., 1998) es capaz de hidrolizar distintos β -lactámicos. Entre ellos, diversas penicilinas y carbapanems como imipenem y meropenem. Además su actividad no es afectada por el inhibidor de β -lactamasas ácido clavulánico (Yang y Crowder, 1999). La β -lactamasa L2 tiene como sitio activo una serina y su forma funcional es dimérica. Su actividad principal es cefalosporinasa aunque también hidroliza el monobactámico aztreonam y es algo más susceptible a los inhibidores de β -lactamasas (Walsh y cols., 1997). De hecho, en el trabajo de Berg y cols. (Berg y cols., 1999), independientemente del origen de los aislados, los niveles de resistencia a β -lactámicos y a combinaciones β -lactámico/inhibidores son bastante elevados. Recientemente, Lambert y cols. han caracterizado una aminoglicosidasa acetil transferasa cromosómica

presente en todos los aislados estudiados (Lambert y cols., 1999) y que podría contribuir a la escasa sensibilidad intrínseca a aminoglicósidos de *S. maltophilia* (King y cols., 1978; Vanhoof y cols., 1995). La caracterización de mutantes *in vitro* seleccionados en presencia de quinolonas indica que diversos mecanismos (mutaciones *gyrA* y cambios en la permeabilidad de la membrana) contribuyen al fenotipo de resistencia (Lecso-Bornet y cols., 1992). En este trabajo, la resistencia cruzada a diversos antibióticos se observó en mutantes que mostraron diferencias en los perfiles de proteína de membrana externa, observándose tanto la pérdida o reducción como la aparición de proteínas (Lecso-Bornet y cols., 1992). Recientemente, estos experimentos se han confirmado y además se ha visto que las proteínas sobreexpresadas son inmunoactivas a anticuerpos específicos contra proteínas implicadas en la resistencia intrínseca de *P. aeruginosa* (Zhang y cols., 2000).

La baja susceptibilidad a antibióticos característica de cepas de *S. maltophilia* puede considerarse un factor de virulencia en pacientes bajo tratamiento antibiótico ya que la probabilidad de infección por *S. maltophilia* puede aumentar debido al uso de los mismos. En este sentido los antibióticos desplazan a la microflora indígena, que actúa como barrera frente a infecciones (Berg, 1996) permitiendo la colonización de bacterias resistentes. Una vez que se ha asentado la población resistente, su erradicación por los métodos antibióticos convencionales es extremadamente difícil. En el caso de *S. maltophilia* el tratamiento más eficaz en la actualidad es el uso de sulfonamidas. Diversos trabajos demuestran que tanto cepas de origen clínico como de origen ambiental son susceptibles a la acción de trimetoprim-sulfametoxazol (Berg y cols., 1999; Arpi y cols., 1996).

1.1.3 Importancia como patógeno oportunista

A partir de mediados de los años 70 ha habido un aumento paulatino en el aislamiento de *S. maltophilia* a partir de muestras clínicas. En la década de los 90, ha sido el bacilo Gram-negativo no fermentativo más comúnmente aislado de muestras clínicas después de *Pseudomonas aeruginosa* (Denton y Kerr, 1998). Los aislamientos de *S. maltophilia* de muestras clínicas provienen de pacientes debilitados o inmunodeprimidos y los factores de riesgo son la hospitalización, la presión antibiótica y la implantación de catéteres (Muder y cols., 1996). A grandes rasgos las bacterias resistentes de origen clínico se pueden dividir en dos grandes grupos: patógenos especializados (*Salmonella typhimurium*, *Vibrio cholera*, etc.) y patógenos oportunistas (*P. aeruginosa*, *Enterococcus* sp., *Staphylococcus aureus*, *S. maltophilia*, etc.). Los primeros se caracterizan porque dan lugar tanto a infecciones comunitarias como nosocomiales (Finlay y Falkow, 1997; McCormick, 1998). Los segundos por el contrario sólo infectan a pacientes severamente debilitados, esencialmente aquéllos hospitalizados (Swartz, 1994). Las especies típicamente patógenas han adquirido el fenotipo virulento mediante un proceso de especialización (Finlay, 1999). Los determinantes de

virulencia están generalmente agrupados en regiones del ADN con un contenido G + C distinto al del genoma baceriano en el que se encuentran, esto sugiere que se han adquirido a través de una transferencia horizontal. Estas regiones reciben el nombre the "islas de patogenicidad" y se han caracterizado en especies de *E. coli*, *Yersinia pestis*, *V. cholerae* y *S. typhimurium* entre otros (Blum y cols., 1994; Buchrieser y cols., 1998; Karaolis y cols., 1998; Deiwick y cols., 1998).

En el caso de los patógenos oportunistas, con una distribución ecológica bastante más amplia, no está claro la diferencia entre cepas virulentas y no virulentas. El patógeno oportunista más estudiado es *P. aeruginosa*, se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza (suelo, aguas, plantas, etc.) (Krieg, 1984) y produce infecciones en pacientes inmunodeprimidos, quemados, intubados,... así como infecciones crónicas en pacientes de fibrosis quística (Quinn, 1998; Govan y Deretic, 1996). Se ha demostrado que tanto aislados de origen clínico como de origen ambiental expresan diversos factores de virulencia (hemolisinas, proteasas e invasividad de células epiteliales) y metabolizan hidrocarburos como única fuente de carbono (Alonso y cols., 1999). Además, el análisis de los patrones de macrorestricción no permite la diferenciación entre cepas aisladas de pacientes de fibrosis quística y cepas aisladas de ambientes acuáticos (Romling y cols., 1994; Foght y cols., 1996). Lo que apunta a una ausencia de especialización entre estirpes patógenas y estirpes ambientales biodegradadoras. En el caso de *S. maltophilia*, no se conocen los mecanismos involucrados en la virulencia y la transmisión de cepas de persona a persona es poco frecuente (Denton y cols., 1998). De hecho, se tiende a asociar a los aislados clínicos de *S. maltophilia* como colonización en vez de una infección real (Laing y cols., 1995). Sin embargo los pacientes colonizados por *S. maltophilia* son tratados con antibióticos por períodos largos, lo que conlleva a la selección de cepas más resistentes. Se han aislado cepas de *S. maltophilia* de diversas infecciones: bacteremia, endocarditis, infección del tracto urinario y respiratorio, meningitis, e infecciones oculares y gastrointestinales (para una revisión ver (Denton y Kerr, 1998)).

La emergencia de patógenos oportunistas con fenotipos multirresistentes es actualmente un importante problema a nivel clínico, debido principalmente a las dificultades de erradicación mediante tratamientos con antibióticos de uso común (Bergogne Berezin y cols., 1993; Swartz, 1994). En este sentido, *S. maltophilia* puede considerarse como un ejemplo claro de éste tipo de patógenos oportunistas multirresistentes que tienen una importancia cada vez mayor en ámbitos hospitalarios.

1.2 Origen y diseminación de la resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos se puede adquirir por transferencia horizontal de genes (contenidos en plásmidos o transposones), por recombinación de ADN fóreo en el cromosoma, o por mutaciones en genes cromosómicos que codifican la síntesis de dianas, la síntesis de sistemas de entrada o la síntesis de mecanismos de detoxificación (Maiden, 1998; Davies, 1994). Actualmente, se acepta que los genes de resistencia a antibióticos, presentes en plásmidos y transposones, se originaron en organismos productores de antibióticos como mecanismos de protección (Cundliffe, 1992). Una vez que el determinante de resistencia ha sido seleccionado, su diseminación entre la población bacteriana ocurre rápidamente. Un ejemplo claro proviene de las similitudes encontradas en la comparación de secuencias nucleotídicas de determinantes de resistencia a aminoglicósidos de cepas productoras y de aislados clínicos (Davies y Wright, 1997). Estudios más recientes indican, sin embargo, que ésta idea no se puede generalizar. La presencia de β -lactamasas en todos los aislados de diversas especies sugiere que los organismos productores no son las únicas fuentes de mecanismos de resistencia a antibióticos (Bush y cols., 1995; Petrosino y cols., 1998; Paton y cols., 1994). Por otra parte, la ubicuidad de los sistemas de eflujo de drogas sugiere que la función primordial u original de estos sistemas no es el transporte de antibióticos (Ma y cols., 1994; Paulsen y cols., 1996). También, se ha descrito que las enzimas "housekeeping" quinasas de azúcares y aciltransferasas pueden haber evolucionado hacia modificadores de aminoglicósidos (Shaw y cols., 1993). Por lo tanto, en la adquisición de un fenotipo de resistencia intervienen diversos factores que contribuyen de distinta forma al fenotipo final (Davies, 1997).

1.3 Mecanismos de resistencia basados en el transporte de antibióticos

1.3.1 Envoltura celular

La estructura lipídica de la membrana que rodea la célula y la presencia de porinas son clave en la barrera a compuestos externos en bacterias Gram-negativas. De hecho, la menor susceptibilidad a compuestos que presentan las bacterias Gram-negativas frente a bacterias Gram-positivas se atribuye a las envueltas celulares (Nikaido, 1989). La capa de peptidoglicano que cubre la membrana citoplasmática en Gram-positivos no constituye una barrera eficiente a la entrada de agentes microbianos. En cambio, en Gram-negativos además del peptidoglicano, la membrana externa y el lipopolisacárido (LPS) contribuyen de forma eficiente a bloquear la entrada de compuestos lipofílicos. Para contrarrestar esta baja permeabilidad, son necesarios otros mecanismos que permitan la entrada de compuestos esenciales (nutrientes, etc.). Esta función la realizan las porinas (Benz y Bauer, 1988). Las porinas son canales acuosos con diámetro de poro de 7 a 10 Å que permiten la entrada de compuestos hidrofílicos relativamente pequeños, mientras que los compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos grandes los atraviesan a velocidades muy bajas. Aún así los β -lactámicos,

compuestos relativamente hidrofílicos, son capaces de difundir a través de estas porinas. La membrana externa de *P. aeruginosa* carece de porinas altamente permeables típicas de la mayoría de los Gram-negativos, habiendo sido sustituidas por porinas menos permeables, de modo que la difusión de compuestos a través de dicha membrana es 100 veces más lenta que en aquéllas que presentan las porinas clásicas (Nikaido y Vaara, 1985). Debido a ésto los antibióticos hidrofílicos difunden muy lentamente hacia el interior celular lo que contribuye a un fenotipo de resistencia intrínseco. Las micobacterias, microorganismos Gram-positivos, también han desarrollado una estrategia parecida a *P. aeruginosa* (Trias y Benz, 1993). La pared de peptidoglicano está envuelta por una capa de arabinogalactano y una capa de ácido micólico, esta estructura constituye una barrera muy eficiente. La entrada de nutrientes se da a través de una porina que permite la difusión de compuestos hidrofóbicos o hidrofílicos grandes aunque a muy bajas velocidades. El resultado de esta estructura también conlleva un fenotipo de resistencia intrínseco.

En la actualidad no disponemos de datos referentes a la composición de la membrana en la especie *S. maltophilia*, aunque Lecso-Bornet y cols. observaron en mutantes con resistencia cruzada a distintos antibióticos modificaciones en el perfil de proteínas de membrana externa (Lecso-Bornet y cols., 1992). Históricamente, cuando se observaba que la resistencia a un determinado compuesto estaba acompañada de una menor acumulación intracelular la explicación que se daba era que la membrana había sufrido cambios que conllevaban una más baja permeabilidad. Estos cambios se relacionaban con una reducción en la expresión de porinas y se han descrito tanto en mutantes obtenidos en laboratorio como en aislados clínicos resistentes (Moore y Hancock, 1986; Burns y cols., 1989; Cohen y cols., 1989). Más recientemente, diversos estudios apuntan que para alcanzar niveles de resistencia significativos no basta con una barrera poco permeable. En este sentido se ha demostrado, que las diferencias en CMIs no son tan grandes entre cepas que carecen de porinas y cepas silvestres (Jaffe y cols., 1983), esto ocurre porque aunque la barrera sea poco permeable no es completamente impermeable a los compuestos de pequeño tamaño. Para alcanzar niveles de resistencia significativos son necesarios otros mecanismos que actúen en sinergia a la baja permeabilidad de la membrana. La presencia de enzimas hidrolíticas de antibióticos ha sido descrita en varias ocasiones como un mecanismo que acoplado a la baja permeabilidad de la membrana conlleva niveles de resistencia elevados. Esto ocurre con los β -lactámicos. El análisis, tanto de mutantes obtenidos en el laboratorio, como de aislados clínicos, ha demostrado que la expresión de β -lactamasas concomitante con la desaparición de porinas es frecuente en mustantes resistentes a combinaciones β -lactámicos combinaciones β -lactámico/inhibidor de β -lactamasas en *E. coli*. (Reguera y cols., 1991; Nayler, 1987). Recientemente, la presencia de sistemas de eflujo activos junto con la baja permeabilidad de la membrana ha sido descrito como el mecanismo más importante de resistencia múltiple en

P. aeruginosa (Li y cols., 1994), *Neisseria gonorrhoeae* (Hagman y cols., 1995) y *E. coli* (Everett y cols., 1996). La concentración intracelular de un compuesto viene dado por el equilibrio entre la entrada y salida de ese compuesto. Por lo tanto, el eflujo de compuestos solamente será eficiente si existe una entrada lenta que no supere la velocidad de salida.

1.3.2 Sistemas de bombeo de drogas

A lo largo de la última década se han descrito y caracterizado distintos sistemas de bombeo de drogas en diversos organismos (vanVeen y Konings, 1998; Paulsen y cols., 1996). Estos sistemas, localizados en la envoltura celular, son responsables del transporte activo unidireccional de drogas desde el citoplasma hacia el medio externo. La mayoría de los sistemas de bombeo de drogas están codificados por genes cromosómicos, aunque en el microorganismo Gram-positivo *S. aureus* se han descrito en plásmidos (Rouch y cols., 1990). Se ha demostrado que estos sistemas son fundamentales para explicar la resistencia intrínseca de ciertos microorganismos (Yoneyama y cols., 1997; Takiff y cols., 1996; Okusu y cols., 1996). Además, mutaciones que conducen a la sobreexpresión de estos sistemas incrementan los valores de CMI de distintos antibióticos, contribuyendo por tanto también a la resistencia adquirida de dichas especies bacterianas (Saito y cols., 1999; Hagman y Shafer, 1995; Fukuda y cols., 1995). Las proteínas de transporte son generalmente proteínas integrales de membrana y poseen dominios tanto en el interior como en el exterior de la membrana citoplasmática. El transporte es llevado a cabo mediante un mecanismo uniporte acoplado a la hidrólisis del ATP o por un mecanismo antiporte en la que el eflujo de la droga está acoplado a la entrada de iones de hidrógeno.

1.3.2.1 Clasificación transportadores

Las proteínas transportadoras localizadas en la membrana citoplasmática se han agrupado en 4 familias en base a la homología de las secuencias y al mecanismo de transporte:

- ATP binding cassette (ABC)
- Staphylococcal (o small) multidrug resistance (SMR)
- Resistance nodulation cell division (RND)
- Major facilitator superfamily (MFS)

Los transportadores ABC (vanVeen y Konings, 1998) utilizan la energía liberada por la hidrólisis de ATP y presentan 2 segmentos transmembrana (cada uno contiene 6 segmentos transmembrana α -hélice) y 2 dominios de unión y de hidrólisis de ATP. Las restantes 3 familias son transportadores secundarios y utilizan el mecanismo antiporte acoplado a la entrada de iones de hidrógeno generado por el gradiente de protones de la membrana, también denominado fuerza motriz de protones. La familia SMR (Paulsen y cols., 1996) agrupa a proteínas de pequeño tamaño (alrededor de 110 aminoácidos). A partir del análisis de los

índices de hidropatía se postula que presentan 4 segmentos que atraviesan la membrana (TMS, transmembrane segments) en forma de α -hélices. Debido al pequeño tamaño de las proteínas SMR, se cree que en la membrana podrían funcionar como complejos triméricos resultando en 12 TMS con estructura de α -hélice. Las proteínas de la familia RND (Saier y cols., 1994) son bastante más grandes (alrededor de 1.000 aminoácidos) y el análisis de los índices de hidropatía de los miembros de esta familia sugieren que presentan 12 TMS en forma de α -hélice. Además se identifican 2 regiones grandes hidrófilas de aproximadamente 300 aminoácidos cada una, que en bacterias Gram-negativas se cree que están localizadas en el espacio periplásmico. Las proteínas de la familia MFS (Marger y Saier, 1993) presentan 12 o 14 TMS α -hélice y son de tamaño medio (alrededor de 400 aminoácidos).

Aparte de proteínas de eflujo de drogas, cada una de estas familias incluye proteínas implicadas en el eflujo de diversos compuestos. Por ejemplo en *Escherichia coli* el transporte de hemolisina al exterior celular se lleva a cabo por el sistema HlyBD-TolC (Wagner y cols., 1983) dependiente de la hidrólisis de ATP. El sistema CyaABDE de *Bordetella pertusis* (Glaser y cols., 1988) implicado en el transporte de la toxina ciclolisina también es dependiente de la hidrólisis de ATP. A su vez, el transporte de diversas proteasas hacia el medio externo en *P. aeruginosa* y en *Erwinia chrysanthemi* es realizado de forma activa por hidrólisis de ATP mediante los sistemas AprDEF (Duong y cols., 1992) y PrtDEF (Letoffe y cols., 1990), respectivamente. La familia SMR es la que está más restringida en cuanto a la diversidad de transportes. Su nombre proviene del primer sistema de bombeo de drogas identificado: *smr* (*Staphylococcus* multidrug resistance) (Heir y cols., 1995) presente en plásmidos de aislados clínicos de *S. aureus*. La familia RND también agrupa a proteínas involucradas en el transporte de diversos compuestos no antibióticos. Las proteínas de esta familia CzcA, CnrA y NccA de especies del género *Alcaligenes* intervienen en el bombeo de iones de metales pesados (Nies y cols., 1989; Liesegang y cols., 1993; Schmidt y Schlegel, 1994). El sistema NolGHI (Baev y cols., 1991) de *Rhizobium meliloti* que se cree que exporta oligosacáridos involucrados en señales de nodulación también es parte de la familia RND. La familia MFS agrupa a proteínas transportadoras responsables del uniporte y antiporte de diversos compuestos tanto de organismos procariotas como de organismos eucariotas. Incluye a más de 300 proteínas. Entre ellas la más estudiadas son la permeasa de lactosa LacY (Kaback y cols., 1990) de *E. coli* y los transportadores de glucosa de la subfamilia GLUT (Gould y Bell, 1990) de humanos.

1.3.2.2 Ubicuidad de los sistemas de bombeo de drogas

La distribución de sistemas de eflujo de drogas está muy extendida entre todos los organismos, tanto eucariotas como procariotas. En procariotas, en la mayoría de los casos están codificados por genes cromosómicos aunque en algunos casos se han encontrado en

elementos extracromosómicos (Paulsen y cols., 1998). En el caso de organismos eucariotas, la glicoproteína P (Gottesman y Pastan, 1993) de origen humano es la que más se ha estudiado. Está codificada por el gen *mdr1* en humanos y roedores y es la responsable de la multirresistencia a agentes anticancerígenos en células tumorales. Diversas proteínas homólogas a la glicoproteína P están descritas como responsables de la resistencia a drogas y son dependientes de la hidrólisis de ATP, tanto en eucariotas como en procariotas. De hecho, se ha descrito que la proteína LmrA, de *Lactococcus lactis* es capaz de conferir resistencia múltiple a drogas cuando se expresa en células de mamífero (van Veen y cols., 1998), lo que indica una importante conservación funcional de este tipo de proteínas a lo largo de la escala evolutiva. Al contrario que en organismos eucariotas y procariotas Gram-positivos, los transportadores de la familia ABC de Gram-negativos (Fath y Kolter, 1993) están involucrados en el transporte de proteínas y en la entrada de nutrientes (aminoácidos, oligosacáridos, etc.), en lugar de compuestos antimicrobianos. En la Tabla 1 se muestran diversos transportadores de sistemas de eflujo de drogas dependientes del potencial de membrana (SMR, RND y MFS). Se observa la ubicuidad de estos sistemas tanto en organismos eucariotas como en organismos procariotas. A diferencia de SMR y MFS, los transportadores RND implicados en el bombeo de drogas están restringidos a bacterias Gram-negativas.

Tabla 1. Transportadores de sistemas de bombeo de drogas dependientes de la fuerza motriz de protones en organismos eucariotas y procariotas.

Proteína	Organismo	Sustratos	Referencia
<u>Familia SMR</u>			
Smr	<i>S. aureus</i>	cationes monovalentes (cristal violeta, bromuro de etidio, tetraciclina)	Paulsen y cols., 1996
EmrE	<i>E. coli</i>	cationes monovalentes (cristal violeta, bromuro de etidio)	Morimyo y cols., 1992
YhiV ^a	<i>E. coli</i>	igual a AcrB	Sofía y cols., 1994
<u>Familia RND</u>			
AcrB ^a	<i>E. coli</i>	naranja de acridina, tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina, ácido fusárico, novobiocina, SDS, deoxicolato, mitomicina C	Ma y cols., 1993
AcrF ^a	<i>E. coli</i>	igual a AcrB	Klein y cols., 1991

(continuación Tabla 1)

MexB ^a	<i>P. aeruginosa</i>	tetraciclina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, β -lactámicos, novobiocina, eritromicina, ácido fusárico, bromuro de etidio, SDS, deoxicolato	Gotoh y cols., 1995
MexD ^a	<i>P. aeruginosa</i>	tetraciclina, cloranfenicol, β -lactámicos (excepto carbapenems), novobiocina, eritromicina, ácido fusárico	Poole y cols., 1996
MexF ^a	<i>P. aeruginosa</i>	cloranfenicol, fluoroquinolonas, carbapenems	Kohler y cols., 1997
MexY ^a	<i>P. aeruginosa</i>	aminoglicósidos, fluoroquinolonas	Mine y cols., 1999
MtrD ^a	<i>N. gonorrhoeae</i>	detergentes, antibióticos hidrofóbicos, agentes de tinción	Sparling y cols., 1975
Familia MFS			
VMAT1	<i>Rattus norvegicus</i>	rodamina, bromuro de etidio.	Liu y cols., 1992
Unc17	<i>Caenorhabditis elegans</i>	acetilcolina	Alfonso y cols., 1993
NorA	<i>S. aureus</i>	quinolonas, cloranefenicol y rodamina	Yoshida y cols., 1990
ActII	<i>Streptomyces coelicolor</i>	actinorodina	Fernández-Moreno y cols., 1991
QacA	<i>S. aureus</i>	acriflavina, cloranfenicol, fluoroquinolonas, rodamina	Rouch y cols., 1990
EmrB ^a	<i>E. coli</i>	ácido nalidíxico, tetraclorosalicilánido, tiolactomicina	Lomovskaya y Lewis, 1992
TetA	<i>E. coli</i>	tetraciclina	Waters y cols., 1983

^a Forman parte de un sistema multicomponente.

1.4. Sistemas de bombeo de drogas RND en bacterias Gram-negativas

La envoltura celular de bacterias Gram-negativas ha condicionado la estructura de los sistemas eflujo. En la Figura 1 se muestra un diagrama de la estructura de sistemas de eflujo de drogas en las envolturas celulares de Gram-positivos y Gram-negativos. En el caso de Gram-negativos, para que el bombeo activo sea eficiente es necesario atravesar la membrana citoplasmática, el espacio periplásmico y la membrana externa mediante un sistema multicomponente. La proteína transportadora localizada en la membrana citoplasmática está

asociada a una proteína localizada en el espacio periplásmico y, aunque no se ha identificado en todos los sistemas, a un canal en la membrana externa.

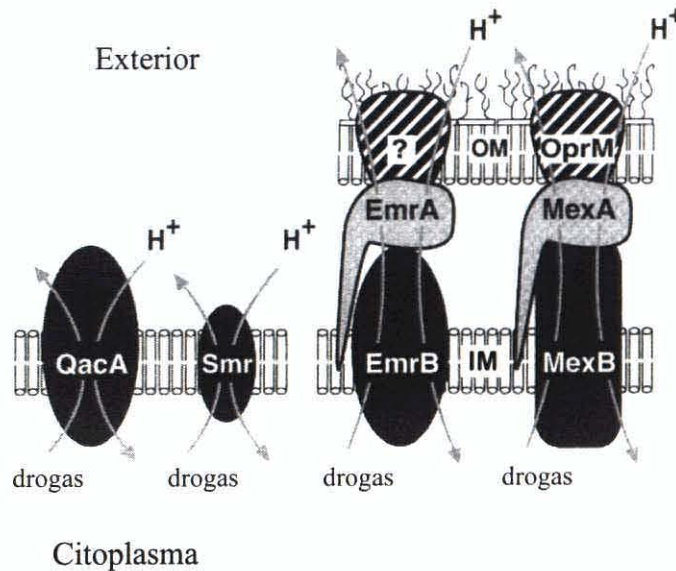


Figura 1. Diagrama de la estructura de los sistemas de eflujo de drogas dependientes de la fuerza motriz de protones en Gram-positivos y Gram-negativos. QacA (*S. aureus*) y EmrB (*E. coli*) son proteínas transportadoras de la familia MFS, Smr (*S. aureus*) de la familia Smr y MexB (*P. aeruginosa*) de la familia RND. Obsérvese que EmrB y MexB están asociados a proteínas ubicadas en el espacio periplásmico (EmrA y MexA) y en la membrana externa (TolC (ver texto) y OprM). Diagrama tomado de Paulsen y cols., 1996.

1.4.1 Componentes estructurales

Las proteínas periplásmicas se encargan de conectar los componentes de la membrana interna y externa del sistema de eflujo y están agrupadas en la familia MFP (membrane fusion proteins) (Dinh y cols., 1994). La familia de proteínas MFP engloba a componentes de diversos sistemas de eflujo involucrados en el bombeo de drogas, en el transporte de toxinas, oligosacáridos y proteínas. Algunas de estas proteínas, por ejemplo HlyD de *E. coli* (Pimenta y cols., 1999), tienen regiones hidrófobas en la región N-terminal por las que se cree que interaccionan con la membrana citoplasmática. Aparte de la región hidrófoba, los componentes MFP de los sistemas de eflujo de drogas tienen una región característica de péptido señal (Hayashi y Wu, 1990). Los análisis de la estructura terciaria y secundaria indican que su forma funcional es trimérica y que interaccionan con los componentes proteicos de las membranas interna y externa. El análisis del alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas ha revelado que aunque las proteínas son divergentes, el dominio

C-terminal se muestra conservado. Actualmente, existen dos teorías para explicar la formación del complejo y su funcionamiento (Johnson y Church, 1999). En el primer modelo la proteína MFS es capaz de forzar el contacto entre la proteína transportadora localizada en la membrana interna y el canal en la membrana externa. La distancia entre los componentes de las dos membranas se reduce y el sustrato atraviesa el complejo. En el segundo modelo, la proteína MFP actuaría como un canal conectando los otros dos componentes y el sustrato atravesaría los tres componentes.

El componente situado en la membrana externa es miembro de la familia OMF (Outer membrane factor) (Paulsen y cols., 1997). Al igual que en la familia MFP, entre los miembros de la familia OMF se encuentran diversas proteínas de sistemas de eflujo de drogas, toxinas, metales y proteínas. A partir de la estructura cristalizada de TolC de *E. coli* (Koronakis y cols., 1997) se ha deducido que su forma nativa es trimérica y que cada monómero presenta un dominio hidrofóbico en forma de β -barril y un dominio periplásmico en la región C-terminal. Estos análisis estructurales sugieren que la región C-terminal interacciona con el componente MFS de los sistemas de eflujo formando un complejo estable.

1.4.2 Descripción de los sistemas más estudiados. Organización génica

La estructura génica de los operones de los sistemas de eflujo de drogas acopladas al transportador RND está bastante conservada (Paulsen y cols., 1996). La Figura 2 muestra un esquema de la organización genética de algunos de los sistemas caracterizados. En algunos casos el gen que codifica la síntesis de la proteína de la familia OMF no se encuentra en el mismo operón transportador-MFP. Esto ocurre con TolC de *E. coli*. Esta proteína, se encuentra asociada a diversos sistemas de eflujo (HlyDB (Wandersman y Delepelaire, 1990), AcrAB (Fralick, 1996), AcrEF (Klein y cols., 1991) y EmrAB (Lomovskaya y Lewis, 1992)) y está involucrado en el transporte de α -hemolisina, en el bombeo de antibióticos y en la tolerancia a solventes orgánicos.

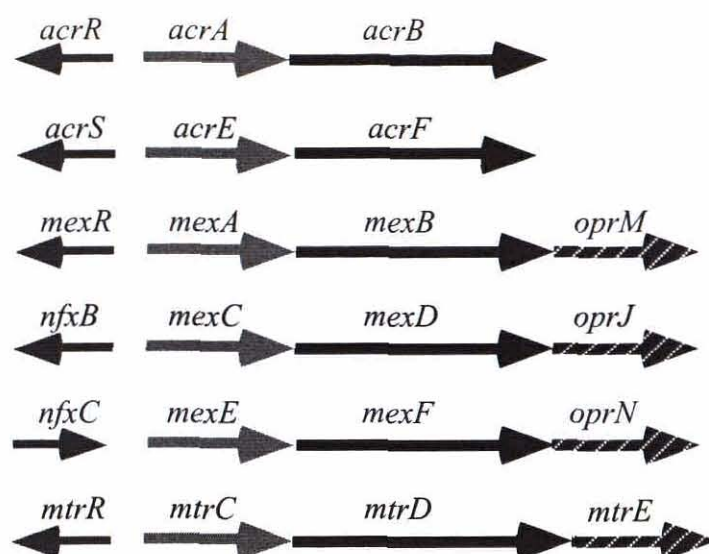


Figura 2. Organización genética de sistemas de eflujo RND. El primer gen corresponde a los reguladores y a continuación los genes de los componentes estructurales: MFP, RND y OMF. En el caso de *acrRAB* y *acrSEF*, el componente OMF (*tolC*) no forma parte del operón.

1.4.2.1 Sistemas Acr de *Escherichia coli*

A finales de los años 60 se describieron una serie de mutantes de *E. coli* resistentes al agente de tinción naranja de acridina, a detergentes y antibióticos (Nakamura, 1968). El locus se denominó *acr* (resistencia a acridina). En 1993, el locus *acr* fue clonado, secuenciado y se identificaron dos genes: *acrA* y *acrB* (Ma y cols., 1993). Estos genes codifican la síntesis de proteínas de la familia MFP y RND, respectivamente. En ese mismo año, se clonó un sistema homólogo y se designó *acrEF* (Klein y cols., 1991), se identificaron 2 genes (*acrE* y *acrF*) y al igual que *acrAB* codifican la síntesis de proteínas de la familia MFP y RND. Los dos sistemas son responsables del eflujo de un amplio rango de antibióticos y de compuestos tóxicos (Tabla 1). Ensayos de acumulación intracelular de naranja de acridina en presencia de inhibidores del potencial de membrana (por ejemplo el carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona, CCCP) indican que el eflujo es dependiente de la fuerza motriz de la membrana. Recientemente, la reconstitución de AcrB en proteoliposomas ha permitido comprobar la dependencia del transportador en el gradiente de protones de la membrana (Zgurskaya y Nikaido, 1999). Se ha comprobado que mutantes *tolC* son menos resistentes a los sustratos de los sistemas AcrAB y AcrEF y por lo tanto se cree que TolC es el componente OMF de estos dos sistemas (Fralick, 1996). La delección o inactivación del operón *acrAB* conlleva un aumento en la susceptibilidad a diversos antibióticos, a sales biliares y ácidos grasos

(Thanassi y cols., 1997). Debido a que las sales biliares y los ácidos grasos están presentes en concentraciones altas en el ambiente natural de bacterias entéricas, se sugiere que el eflujo de estos compuestos puede ser una de las funciones fisiológicas del sistema AcrAB en *E. coli*. Además, se ha comprobado que en presencia del ácido graso decanoato la expresión de AcrAB *E. coli* aumenta (Ma y cols., 1995). También, se ha visto que condiciones de estrés como 4% etanol, 0.5 M NaCl o fase estacionaria de crecimiento producen un aumento de la expresión de *acrAB* (Ma y cols., 1995). Aguas arriba de cada uno de los operones *acrAB* y *acrEF*, se transcriben en sentido divergente posibles represores transcripcionales de los sistemas. Los productos proteicos codificados por *acrR* (del sistema *acrAB*) y *acrS* (del sistema *acrEF*) (Ma y cols., 1994) muestran homología con diversas proteínas reguladoras de la subfamilia TetR. El análisis de fusiones *acrAB-lacZ* ha confirmado que la expresión de este sistema es dependiente de AcrR y de MarR (multi-antibiotic resistance) (Ma y cols., 1995). MarR forma parte del operón *marRAB* responsable de la respuesta global al estrés (Aleksun y Levy, 1997). Ma y cols. han propuesto que la regulación de la expresión de *acrAB* es dependiente principalmente de MarR y que AcrR actúa como modulador secundario evitando la sobreexpresión de *acrAB* (Ma y cols., 1996).

1.4.2.2 Sistemas Mex de *Pseudomonas aeruginosa*

Diversos estudios relacionados con el fenotipo de multirresistencia en *P. aeruginosa* identificaron tres clases de mutantes (*nalB*, *nfxB* y *nfxC*) responsables de la resistencia cruzada a distintos antibióticos. Cada uno de estos mutantes sobreexpresa proteínas de membrana externa entre 50 y 54 kDa. Los mutantes *nalB* (Rella y Haas, 1982; Masuda y Ohya, 1992) sobreexpresan OprM (50 kDa), los mutantes *nfxB* (Masuda y cols., 1996), OprJ (54 kDa) y los mutantes *nfxC* (Fukuda y cols., 1995; Masuda y cols., 1995), OprN (50 kDa). Posteriormente se comprobó que cada una de estas proteínas forma parte de los sistemas de eflujo *mexABoprM* (Gotoh y cols., 1995), *mexCDoprJ* (Poole y cols., 1996) y *mexEFoprN* (Kohler y cols., 1997) (*mex*, viene de multidrug efflux pump). Las proteínas transportadoras de estos sistemas, MexB, MexD y MexF, son miembros de la familia RND y están asociadas a proteínas de las familias MFP y OMF. Aguas arriba del operón *mexABoprM* y en sentido divergente se transcribe el represor transcripcional *mexR* (Poole y cols., 1996). Posteriormente, se ha comprobado que las mutaciones *nalB*, que conllevan la sobreexpresión del sistema MexABOprM, están localizados en la secuencia *mexR* (Saito y cols., 1999). Tanto en mutantes multirresistentes obtenidos *in vitro* como en aislados clínicos multirresistentes que sobreexpresan el sistema MexAB-OprM, se han identificado mutaciones puntuales que conllevan un cambio aminoacídico, así como inserciones y deleciones (Ziha-Zarifi y cols., 1999; Srikumar y cols., 2000) localizadas en el gen *mexR*. El represor transcripcional del sistema *mexCDoprJ*, *nfxB*, también se encuentra aguas arriba y se transcribe en sentido divergente al operón estructural (Okazaki y Hirai, 1992). Estos dos represores, NalB y NfxB,

muestran homología con la subfamilia de reguladores TetR. Las mutaciones en *mexR* que producen un fenotipo de multirresistencia se han localizado en la región hélice-giro-hélice (HTH, helix-turn-helix) de unión al ADN y en regiones no implicadas en la unión al ADN. Por el contrario, el sistema *mexEFoprN* es regulado positivamente por NfxC y el gen que codifica éste se transcribe en el mismo sentido que el operón estructural (Kohler y cols., 1997). A diferencia de NalB y NfxB, NfxC muestra homología con la subfamilia LysR. El rango de sustrato de los tres sistemas se superpone (Tabla 1). El sistema MexABOprM parece que es el más relevante ya que OprM se expresa de forma mayoritaria en mutantes multirresistentes obtenidos *in vitro* (Kohler y cols., 1997; Alonso y cols., 1999) y es el responsable de la resistencia intrínseca de cepas silvestres (Hosaka y cols., 1995).

1.4.2.3 Sistema Mtr en *Neisseria. gonorrhoeae*

El locus *mtr* (multiple transferable resistance) de *N. gonorrhoeae* está implicado en la resistencia a antibióticos hidrofóbicos, detergentes, sales biliares y ácidos grasos (Sparling y cols., 1975). Se han aislado diversas cepas clínicas resistentes que sobreexpresan el sistema Mtr (Veal y cols., 1998). El locus *mtr* está compuesto por *mtrR*, que codifica la síntesis de un represor transcripcional de la subfamilia TetR, y por el operón *mtrCDE*, que codifica la síntesis de los componentes de las familias MFP, RND y OMF, respectivamente (Hagman y cols., 1995). Se han identificado diversas mutaciones en el sistema *mtr* en aislados clínicos multirresistentes de *N. gonorrhoeae*, con distinta respuesta en el fenotipo de multirresistencia (Shafer y cols., 1995; Hagman y Shafer, 1995). Las mutaciones dentro del gen *mtrR* conllevan niveles intermedios de resistencia mientras que la delección de un nucleótido en una repetición invertida de 13 pb presente en la zona intergénica entre *mtrR* y *mtrCDE* produce niveles altos de resistencia. Estos datos indican que, tanto las mutaciones en los factores de transcripción, como en las zonas promotoras pueden ser relevantes para modular la expresión de sistemas de eflujo de antibióticos. Al igual que en *mexR* de *P. aeruginosa*, las mutaciones en *mtrR* que confieren un fenotipo de multirresistencia están localizadas tanto en la región HTH como fuera de ésta. Mediante ensayos de retardo en gel se ha comprobado que la proteína MtrR salvaje se une a la región promotora del operón *mtrCDE*, mientras que mutaciones en la región HTH de la proteína represora inhiben la unión al ADN (Lucas y cols., 1997). Aunque en 1978 el locus *mtr* no estaba caracterizado, Eisenstein y Sparling (Eisenstein y Sparling, 1978) observaron que las mutaciones *mtr* estaban asociadas a una disminución en el tiempo de generación en comparación con cepas silvestres. En aquella época, las mutaciones *mtr* se atribuían a cambios de permeabilidad ya que producían fenotipos de multirresistencia. Más recientemente, se ha demostrado sin embargo que estas mutaciones conducen a la sobreexpresión del sistema *mtrCDE* de bombeo múltiple de antibióticos (Shafer y cols., 1995).

1.4.3 Sustratos naturales

Una característica común de los sistemas de bombeo RND es el amplio rango de sustratos que son capaces de transportar. Aunque no se conocen a nivel molecular los mecanismos de reconocimiento del sustrato, actualmente se acepta que las características físicas de los compuestos (carga, hidrofobicidad o anfipatía) determinan de algún modo la especificidad de los sistemas de bombeo (Paulsen y cols., 1996). En el caso del transportador dependiente de la hidrólisis de ATP, la glicoproteína P de organismos eucariotas, se observa que los sustratos que transporta son generalmente hidrofóbicos (Gottesman y Pastan, 1993). Se han propuesto modelos para explicar los mecanismos de reconocimiento y transporte de compuestos por parte de la glicoproteína P. Aunque de momento ninguno de estos modelos se han comprobado o desechado mediante experimentos, se cree que la glicoproteína P actúa como una flipasa (Higgins y Gottesman, 1992). El transportador sería capaz de exportar cualquier sustrato hidrofóbico capaz de intercalarse apropiadamente en la membrana. A partir de éste modelo propuesto para la glicoproteína P, se sugiere que los demás transportadores con rango amplio de sustratos hidrofóbicos podrían funcionar de manera similar.

Por otra parte, la aparente insepecificidad y la ubicuidad de los sistemas de bombeo hace pensar que la función fisiológica de estos sistemas es la de proteger las células de compuestos tóxicos "naturales". Siguiendo este razonamiento, el hecho de que confieran un fenotipo de multirresistencia de relevancia clínica no es más que algo fortuito. Se han descrito diversos mutantes de *E. coli* y de *Pseudomonas* sp. resistentes a antimicrobianos seleccionados por presión antibiótica, que muestran un aumento en la tolerancia a solventes orgánicos como el ciclohexano, *n*-pentano o *p*-xileno (Aono y cols., 1995). Por otra parte, la incubación con detergentes, biocidas, metales pesados, u otro tipo de compuestos, puede provocar también la selección de mutantes multirresistentes a antibióticos (Moken y cols., 1997; Hernandez y cols., 1998; Martinez Martinez y cols., 1999). En el caso de mutantes tolerantes a solventes orgánicos de *E. coli*, se ha observado que la transcripción de los genes *acrAB* es elevada (Asako y cols., 1997). Algunas de éstas mutaciones se han mapeado en el represor transcripcional *marR* del operón *marRAB* implicado en la respuesta general al estrés por compuestos oxidativos (*locus soxRS*) y antimicrobianos (*locus emrRAB* y *acrRAB*) (Aleksun y Levy, 1997). La proteína mutada MarR no es capaz de reprimir la síntesis de MarA, y éste actúa como un activador transcripcional de los de los *locus soxRS*, *mrRAB* y *acrRAB*. Además, se ha observado que la sobreexpresión de MarR en cepas de *E. coli* conduce a una reducción en la tolerancia a solventes orgánicos (Seoane y Levy, 1995). Como se ha dicho antes, también se ha observado que la expresión de *acrAB* aumenta en presencia del ácido graso decanoato y que en paralelo aumenta la resistencia a sales biliares (Ma y cols., 1995).. Debido a que el ambiente natural de *E. coli* es rico en sales biliares y en ácidos grasos,

se infiere que la función primordial del sistema AcrAB podría ser la de protección frente a éstos inhibidores.

En el caso de *P. aeruginosa*, se ha visto que la sobreexpresión de los sistemas *mexABoprM* (Li y cols., 1995) y *mexEFoprN* (Kohler y cols., 1997) conduce a una reducción en la producción del sideróforo piocianina. Posteriormente, se comprobó que la homoserina lactona PAI-1 es un sustrato del sistema MexABOprM (Evans y cols., 1998). PAI-I está implicado en la regulación de genes cuya expresión es dependiente de la concentración de células en el medio (proceso que se conoce como *quorum sensing*) (Fuqua y cols., 1996). Algunos de estos genes están implicados en la producción de factores de virulencia tales como piocianina, proteasas de caseína, elastasas, etc. . La reducción de los niveles intracelulares de PAI-1 debido a la actividad de MexABOprM conduce por tanto a una menor producción de diversos factores de virulencia (Evans y cols., 1998). Aún así, los autores de estos trabajos concluyen que la función primordial del sistema MexABOprM en *P. aeruginosa* no es la de modular el *quorum sensing*. Por otra parte, se ha observado que los sistemas Mex confieren tolerancia a solventes orgánicos, siendo el sistema MexABOprM el más relevante (Li y cols., 1998). Dos grupos que trabajan con la tolerancia a solventes orgánicos en *Pseudomonas putida*, han clonado y caracterizado dos sistemas de eflujo implicados en el bombeo de solventes: *srpABC* (Kieboom y cols., 1998) y *tigABC* (Ramos y cols., 1998). Estos dos sistemas son homólogos a los sistemas MFP-RND-OMF implicados en el bombeo de antibióticos caracterizados en bacterias Gram-negativas. Se propone que la actividad de los sistemas Srp y Ttg en cepas de *P. putida* en sinergia con alteraciones en la composición de los fosfolípidos de la membrana confiere niveles elevados de tolerancia a solventes orgánicos (Segura y cols., 1999).

Todos estos ejemplos ponen de manifiesto la implicación de los sistemas de bombeo en diversos procesos celulares. Aún queda por saber si cada uno de éstos sistemas tienen una función específica primordial y de forma fortuita están implicados en otros procesos (como resistencia a antibióticos) o si, por el contrario, son mecanismos generales implicados en una respuesta global a situaciones de estrés.

1.5. Coste asociado al fenotipo de resistencia

El aumento en el uso de antibióticos y la facilidad de adquisición de determinantes de resistencia han provocado la emergencia de bacterias con fenotipos resistentes. La estrategia adoptada para impedir la distribución de los determinantes de resistencia y emergencia de cepas resistentes ha sido la de reducir el uso de compuestos antibióticos. Está generalmente aceptado que la adquisición de un fenotipo de resistencia produce un coste (reducción de *fitness*) a la bacteria (Andersson y Levin, 1999). En un ambiente libre de antibióticos los

microorganismos más susceptibles podrían ser capaces de desplazar a las cepas más resistentes. Éste razonamiento podría explicar el hecho de que si todos los microorganismos presentan en sus genomas sistemas de bombeo de antibióticos, ¿por qué no se han establecido los mutantes que sobreexpresan estos sistemas? En presencia de antibióticos la sobreexpresión de los sistemas de bombeo confiere una ventaja ecológica aún siendo un sistema que consuma energía. En cambio, la ausencia de compuestos nocivos permitiría que las cepas más sensibles y en mejores condiciones fisiológicas desplacen a las cepas más resistentes.

A pesar de estas ideas, hay muy pocos estudios que demuestren formalmente esta reducción en el *fitness* de las bacterias resistentes. En ocasiones, el coste fisiológico asociado al fenotipo de resistencia incluye una reducción en la capacidad de virulencia en cepas patógenas. Un ejemplo claro es la resistencia a estreptomicina debida a mutaciones en el gen *rpsL* en cepas de *E. coli* y *S. typhimurium*. Dependiendo del tipo de mutación (restrictiva o no restrictiva) en el gen *rpsL* se observan 2 fenotipos (Bjorkman y cols., 1999). La mutación de tipo restrictivo conlleva a una atenuación en la virulencia en modelos *in vivo* y a una reducción en la tasa de crecimiento, mientras que el comportamiento fisiológico de cepas con mutaciones no restrictivas no se ve afectado. Los dos tipos de mutaciones se han identificado tanto *in vivo* como *in vitro*. Sin embargo, empleando modelos animales se ha visto que cepas con mutaciones restrictivas rápidamente adquieren mutaciones que conducen una mejora en el estado fisiológico: hay un aumento en la tasa de crecimiento y una recuperación de la capacidad virulenta (Bjorkman y cols., 1998; Bottger y cols., 1998). Otro ejemplo de adquisición de mutaciones compensatorias se ha observado en *Micobacterium tuberculosis* (Sherman y cols., 1996). La actividad catalasa-peroxidasa de KatG es un factor importante en la supervivencia de *M. tuberculosis* en el huésped. Mutaciones que eliminan esta actividad bloquean la activación de isoniazida y son responsables de la resistencia de *M. tuberculosis* a ésta droga. Se podría pensar que los mutantes resistentes a isoniazida serán menos virulentos que los silvestres sensibles a la droga. Sin embargo, el análisis de las cepas resistentes puso de manifiesto que la capacidad de virulencia no estaba afectada. Se habían dado mutaciones compensatorias en el gen que codifica la síntesis de una alkil peroxidasa AphC y que sustituye la actividad de KatG en la supervivencia de *M. tuberculosis* en el huésped (Sherman y cols., 1996).

Aunque los mutantes que sobreexpresan sistemas de bombeo tienen un papel importante en el desarrollo de la resistencia a antibióticos, poco se sabe en cuanto al efecto de dichas mutaciones en la competitividad ecológica de las poblaciones bacterianas. Cabría pensar que el gasto energético asociado al funcionamiento de estos sistemas con una falta tan acusada de especificidad de sustrato supone una desventaja ecológica que conllevaría a la

desaparición de mutantes que sobreexpresen tales sistemas. Sin embargo, la distribución ubicua y la actividad de los sistemas de bombeo pone de manifiesto que han sobrevivido al supuesto coste fisiológico que supone su existencia.

2. Objetivos

La emergencia de *S. maltophilia* como un patógeno oportunista y el elevado nivel de resistencia que presenta a diversos antibióticos, nos ha llevado a proponernos una serie de objetivos:

1. Obtención de mutantes de *S. maltophilia* con fenotipo de multirresistencia por presión antibiótica *in vitro*.
2. Clonaje de los genes implicados en el fenotipo de multirresistencia.
3. Asignación de funciones de los distintos componentes de los sistemas de bombeo, en base a la homología con secuencias previamente conocidas.
4. Análisis funcional del sistema de multirresistencia.
5. Análisis de la regulación de la expresión del sistema de multirresistencia.
6. Estudio de la incidencia del sistema de multirresistencia en aislados clínicos.
7. Estudio del coste biológico asociado al fenotipo de multirresistencia.

3. Materiales y Métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Cepas bacterianas y plásmidos

Para la realización de este trabajo se emplearon aislados clínicos de *S. maltophilia* provenientes del Hospital de Móstoles (Tabla 2). La cepa *S. maltophilia* D457R es un mutante resistente a antibióticos espontáneo obtenido en el laboratorio mediante selección con tetraciclina (10 µg/ml). Como herramientas de clonaje y expresión se han empleado las cepas de *E. coli* que se describen en la Tabla 2. Los plásmidos utilizados a largo de este trabajo se describen en la Tabla 3.

Tabla 2. Cepas de *S. maltophilia* y *E. coli* empleadas a lo largo del trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia/Origen
<i>S. maltophilia</i>		
D457	Fecha aislamiento: enero/1992	Muestra: aspirado bronquial
D457R	derivado de D457	Hospital de Móstoles
	fenotipo multirresistente	Este trabajo
C047	octubre/1990	orina
C048	noviembre/1990	orina
C357	marzo/1991	orina
D388	diciembre/1991	orina
E301	octubre/1992	orina
E539	enero/1993	pus herida
E729	marzo/1993	orina
E759	marzo/1993	esputo
E824	abril/1993	sangre
E847	mayo/1993	sangre
E923	junio/1993	esputo
E999	julio/1993	secreción respiratoria
F227	noviembre/1993	sangre
F375	enero/1994	sangre
F861	agosto/1994	esputo
G51	noviembre/1994	sangre
<i>E. coli</i>		
K4401	cepa silvestre	Ma y cols., 1995
KZM120	derivado K4401, <i>DacrAB::Tn903kan^r</i>	"
AA68	derivado KZM120 Rf, seleccionado en 50 mg rifampicina /ml	Este trabajo
LE392	<i>supE44 supF58 hsdR514 galK2 galT22 metB1 trpR55 lacY1</i>	Sambrook y cols., 1989

(continuación Tabla 2)

AA81	derivado LE392, <i>DacrAB::Tn903kan^r</i>	Este trabajo
TG1	<i>supE hsdD5 thi D(lac-proAB)</i> <i>F'[traD36 proAB⁺ lacI^r lacZDM15]</i>	Sambrook y cols., 1989
AA72	derivado TG1, <i>DacrAB::Tn903kan^r</i>	Este trabajo
HB101	<i>supE44 hsdS20(r_{BMB}) recA13 ara-14 proA2</i> <i>lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	Sambrook y cols., 1989

kan^r, resistente a kanamicina; *Rf^r*, resistente a rifampicina.

Tabla 3. Plásmidos empleados a lo largo de este trabajo.

Plásmido	Descripción	Referencia/Origen
pUC19	Vector de alto numero de copias, Ap ^r	Sambrook y cols., 1989
pERY	Derivado de pUC19, contiene un fragmento cromosómico <i>Bam</i> HI de 6,8 kpb de <i>S. maltophilia</i> D457R.	Este trabajo
pERY1	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de 5,5 kpb del inserto clonado en pERY.	"
pERY2	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de 1,3 kpb del inserto clonado en pERY.	"
pLAFR3	Cósmido para clonaje de bajo número de copias; Tc ^r	Sambrook y cols., 1989
pAS1	Derivado de pLAFR3, contiene un fragmento cromosómico <i>Bam</i> HI de 30 kpb de <i>S. maltophilia</i> D457R.	Este trabajo
pUCE1	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI de 12 kpb del inserto clonado en pAS1.	"
pUCE2	Derivado de pUC19, contiene el operón <i>smeDEF</i> del fragmento <i>Eco</i> RI de 9kpb clonado en pAS1.	"
pUCEH2	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III de 4 kpb del inserto clonado en pAS1.	"
pUCEH3	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III de 3,5 kpb del inserto clonado en pAS1.	"
pUCEH4	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III de 2,5 kpb del inserto clonado en pAS1.	"
pUCEH5	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III de 1 kpb del inserto clonado en pAS1.	"
pUCP1	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 1 kpb del inserto clonado en pUCE2.	"

(continuación Tabla 3)

pUCP2	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 1,6 kpb del inserto clonado en pUCE2.	“
pUCP3	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 1,2 kpb del inserto clonado en pUCE2.	“
pUCP4	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 0,8 kpb del inserto clonado en pUCE2.	“
pUCP5	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 0,7 kpb del inserto clonado en pUCE2.	“
pUCP8	Derivado de pUC19, contiene un fragmento <i>Pst</i> I de 0,3 kpb del inserto clonado en pUCE2.	“
pCK01	Vector de bajo número de copias; Cm ^r	Fernández y cols., 1995
pAS2	Derivado de pCK01, contiene el operón <i>smeDEF</i> del fragmento <i>Eco</i> RI de 9 kpb clonado en pAS1.	Este trabajo
pRK2013	Km ^r <i>ori</i> V <i>ColE1</i> RK2- <i>mob</i> ⁺ RK 2- <i>tra</i> ⁺ , Plásmido auxiliar en conjugaciones tripartitas.	Figurski y Helinski, 1979

Ap^r, resistente a ampicilina; Tc^r, resistente a tetraciclina; Cm^r, resistente a cloranfenicol; Km^r, resistente a kanamicina.

3.1.2 Medios de cultivo

Los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las cepas bacterianas fueron los medios ricos Luria-Bertani (LB) y Mueller Hinton (MH) descritos previamente (Atlas, 1993). Cuando fue necesario, se añadieron antibióticos a las concentraciones indicadas en cada caso.

3.1.3 Soluciones de antibióticos

Ácido nalidíxico (NI): se preparó en una solución 50 mM NaOH a una concentración de 10 mg/ml.

Ampicilina (Ap): se preparó en agua a una concentración de 100 mg/ml.

Cloranfenicol (Cm): se preparó en etanol a una concentración de 10 mg/ml.

Ciprofloxacina (Cx): se preparó en una solución 50 mM NaOH a una concentración de 10 mg/ml.

Eritromicina (Em): se preparó en 50% etanol a una concentración de 10 mg/ml.

Imipenem (Ip): se preparó en agua a una concentración de 5 mg/ml.

Kanamicina (Km): se preparó en agua a una concentración de 50 mg/ml.

Norfloxacin (Nx): se preparó en una solución 50 mM NaOH a una concentración de 10 mg/ml.

Ofloxacin (Ox): se preparó en una solución 50 mM NaOH a una concentración de 5 mg/ml.

Rifampicina (Rf): se preparó en metanol a una concentración de 25 mg/ml.

Tetraciclina (Tc): se preparó en 50% etanol a una concentración de 10 mg/ml.

3.1.4 Soluciones y tampones

Soluciones para el lavado de células:

Tampón fosfato salino (PBS): fosfato pH 7,2 10 mM y NaCl 0,85%.

Tampón fosfato magnesio: Tris-Cl 25 mM pH 7,5 y MgCl₂ 10 mM.

Soluciones para el análisis de proteínas:

Tampón de lisis: urea 6 M, thiourea 2 M, CHAPS 4%, tampón IPG 1% y TCEP-HCl 1 mM.

Tampón de carga SDS 5x: Tris-Cl 250 mM pH6,8, ditiotretitol 500 mM, SDS 10%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 50% .

Tampón de Tris-glicina: Tris 25 mM, glicina 250 mM pH 8,3, SDS 0,1%.

Solución de bloqueo: Tris-Cl 50 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, Tween 20 0,1%, leche descremada en polvo 2%.

Tampón de transferencia: Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,0375%, metanol 20%.

Solución de tinción: Rojo Ponceau 0,1%.

Soluciones para el análisis de ácidos nucleicos:

Tampón TE: Tris-Cl 10mM pH 8,0 y EDTA 1mM pH 8,0.

Solución I (lisis alcalina): glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM pH 8,0.

Solución II (lisis alcalina): NaOH 0,2 M, SDS 1%.

Solución III (lisis alcalina): potásico 3M, acético 5M.

Tampón de carga 6x: azul de bromofenol 0,25%, xilen cianol FF 0,25%, glicerol 30%.

Tampón MOPS 10x (electroforesis de ARN): MOPS 0,2 M, pH 7,0, acetato sódico 80 mM, EDTA 0,5 mM pH 8,0.

Tampón TAE 10x: Tris-acetato 40 mM y EDTA 10 mM.

Solución de desnaturalización: NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M.

Solución de neutralización: NaCl 1,5 M, Tris-Cl 0,5 M pH 7,2, EDTA 0,001 M.

Solución de tinción: azul de metileno 0,002%, acetato sódico 0,3 M pH 5,2.

SSPE 20%: NaCl 3,6 M, fosfato sódico 0,2 M EDTA 0,02 M pH 7,7.

Solución de Denhardt's: seroalbúmina bovina 2% (p/v), Ficoll 2% (p/v), polyvinilpirrolidona 2% (p/v).

Solución de prehibridación: SSPE 5x, solución de Denhardt 5x, SDS 0,5%.

Solución de lavado A: SSPE 2x y SDS 0,1%.

Solución de lavado B: SSPE 1x y SDS 0,1%.

Extracción de ATP y ADP:

Tampón de lisis: 100 mM Tris, 4 mM EDTA, pH 7,75.

3.2 Métodos

3.2.1 Condiciones de cultivo y conservación de las cepas

Tanto las cepas de *S. maltophilia* como las de *E. coli* se crecieron a 37°C con agitación. La conservación de las cepas bacterianas se realizó a partir de cultivos de aproximadamente 16 h, añadiendo glicerol a una concentración final del 20% y manteniéndolos a -80°C.

3.2.1 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

La CMI es la mínima concentración de antibiótico que inhibe el desarrollo de un organismo. La determinación de la CMI a bromuro de etidio se realizó por el método clásico de dilución en placa de multi-pocillos (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997). La solución madre de bromuro de etidio fue preparada en agua a una concentración de 10 mg/ml. Las CMIs a antibióticos se determinaron empleando tiras de E-test (AB Biodisk). Las tiras de E-test son tiras de plástico no poroso de 6 cm que contienen un gradiente del antibiótico. Para determinar las CMIs, las tiras se ponen sobre medio de cultivo sólido previamente sembrado con el microorganismo. Tras 16 horas de incubación a 37°C se observa un crecimiento uniforme y un halo de inhibición alrededor de la tira. El punto de corte del halo con la tira es la CMI del antibiótico para ese microorganismo. Como medio de cultivo, se empleó MH agar para los aislados clínicos de *S. maltophilia* y LB agar para las cepas de *E. coli*.

3.2.2 Ensayos de acumulación intracelular

Los experimentos de acumulación intracelular de tetraciclina, quinolonas y bromuro de etidio se realizaron a partir de cultivos crecidos hasta la fase exponencial (D.O.₆₀₀ entre 0,4 y 0,5) en medio LB a 37°C. Para la obtención de las suspensiones bacterianas se siguió el protocolo descrito previamente (Li y cols., 1994). Los cultivos en fase exponencial se centrifugaron 10 min a 6.000 xg y los sedimentos celulares se lavaron en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0. El sedimento celular se resuspendió en tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0, MgSO₄ 1 mM y glucosa al 0,2% en 1/5 del volumen inicial del cultivo. Las suspensiones se incubaron 10 min a 37°C en agitación suave antes de proceder con los ensayos de acumulación. Como desacoplante del gradiente de protones de la membrana se empleó el carbonil cianuro *m*-clorofenil hidrazona (CCCP). Este se preparó en metanol a 50

mM y se utilizó a una concentración final de 100 μ M. Los valores de acumulación de tetraciclina y de quinolonas se normalizaron teniendo en cuenta la concentración de proteína total en cada muestra. La concentración de proteína se determinó con el kit BCA (Pierce) empleando seroalbúmina bovina como estándar.

3.2.2.1 Tetraciclina

Para el ensayo de acumulación se utilizó [3 H]tetraciclina (DuPont) y se siguió el protocolo descrito con anterioridad (Li y cols., 1994). A tiempo 0 se añadieron 30 μ l de [3 H]tetraciclina (375 nCi) a 1,5 ml de la suspensión bacteriana. Se volvió a incubar a 37°C y cada 5 min se recogieron 3 alícuotas de 50 μ l. Las alícuotas se diluyeron inmediatamente en 1,5 ml de tampón fosfato sódico 50 mM pH 7,0, LiCl 100 mM y se filtraron a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro (Millipore). Los filtros se lavaron 2 veces con 3 ml del tampón indicado arriba y se dejaron secar a temperatura ambiente. En el minuto 10, la suspensión bacteriana se dividió en dos partes iguales y a una de las mitades se añadió CCCP. El ensayo se siguió por un tiempo total de 30 min tomando muestras cada 5 min. La radioactividad retenida en los filtros se cuantificó en un contador de centelleo Wallac 1410 añadiendo a cada filtro 3 ml de líquido de centelleo CytoScint (ICN).

3.2.2.2 Quinolonas

Para los ensayos de acumulación de norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina se siguió el método fluorométrico descrito previamente (Chapman y Georgopapadaku, 1989). Los ensayos con cada quinolona se realizaron en paralelo. A tiempo 0, se añadió cada quinolona a una concentración final de 10 μ g/ml a 4 ml de la suspensión bacteriana. La suspensión bacteriana se volvió a incubar a 37°C durante 10 min, tras los cuales se dividió en dos partes iguales. A cada una de las mitades se añadió CCCP, volviéndose a incubar a 37°C durante otros 10 min. Pasado este tiempo se recogieron 3 alícuotas de 0,5 ml de cada suspensión y se diluyeron en 1 ml de tampón fosfato sódico. Las alícuotas se centrifugaron 1 min a 15.000 xg y los sedimentos se lavaron en el mismo tampón. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml del tampón de lisis glicina 0,1 M pH 3,0 y se dejó 1 hora a temperatura ambiente. El sobrenadante se recuperó centrifugando la suspensión 5 min a 15.000 xg. La concentración de cada quinolona se estableció en un espectrofluorímetro Hitachi F-2500 a partir de la medida de los sobrenadantes libre de restos celulares, utilizando como patrones concentraciones conocidas de cada quinolona. Las longitudes de onda de excitación y de emisión para determinar las concentraciones de norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina fueron de 281 y 440 nm, 292 y 496 nm, y 275 y 448 nm, respectivamente.

3.2.2.3 Bromuro de Etidio

Para el ensayo de acumulación de bromuro de etidio se siguió el método fluorométrico descrito con anterioridad (Neyfakh y cols., 1991). En este caso el ensayo se realizó de forma continua ya que la intensidad de fluorescencia de la muestra es proporcional a la cantidad intracelular de bromuro de etidio. El aumento de la fluorescencia del etidio se debe a su unión a componentes intracelulares, principalmente a ácidos nucleicos. A tiempo 0, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 10 µg/ml a 2 ml de suspensión bacteriana y el cambio en la intensidad de fluorescencia se siguió en un espectrofluorímetro Hitachi F-2500 equipado con un baño a 37°C y con agitación. La longitud de onda de excitación fue de 530 nm y de emisión fue de 600 nm. A tiempo 5 min, se añadió CCCP y se siguió midiendo la fluorescencia durante otros 5 min.

3.2.3 Fraccionamiento subcelular

El fraccionamiento celular se realizó según una modificación del método descrito previamente (Fukuoka y cols., 1991) que se basa en la solubilización diferencial de la membrana interna y externa en presencia de detergentes. Las modificaciones introducidas fueron la sustitución de Sarkosyl NL-96 por Triton X-100 como agente solubilizante de la membrana interna y para volúmenes mayores de 5 ml de cultivo se optó por la rotura de las células en el French Pressure Cell Press (Sim-Aminco) a 1.000 psi en lugar de hacerlo por sonicación. Las fracciones correspondientes al extracto total y a la membrana externa se guardaron a -20°C hasta su utilización. La concentración de proteínas se determinó con el kit BCA (Pierce) empleando como estándar seroalbúmina bovina.

3.2.4 Análisis de proteínas

3.2.4.1 Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (PAGE-SDS)

El análisis electroforético de las proteínas de los extractos totales y de las membranas externas se realizó por métodos previamente descritos (Sambrook y cols., 1989). Se analizaron en geles PAGE-SDS empleando las concentraciones más convenientes de acrilamida:bisacrilamida (39:1). Como marcador de peso molecular se utilizó un marcador comercial de amplio rango (BioRad). La tinción de los geles PAGE-SDS se realizó con el producto Gel Code Blue (Pierce).

3.2.4.2 Electroforesis bidimensionales

La separación de proteínas en geles bidimensionales se realizó en el Servicio de Proteómica del CNB. La extracción de las proteínas contenidas en los extractos celulares de *S. maltophilia* D457 y D457R (Abs_{600} 0,4 a 0,5) se realizó con el tampón de lisis durante 1 h. El sobrenadante se recuperó por ultracentrifugación y se guardó a -20°C hasta su utilización. La separación según el punto isoelectrónico se realizó empleando tiras de un gradiente continuo

de pH 4 a 7 de 18 cm de longitud (PharmaciaBiotech) según está previamente descrito (Gorg y cols., 1995). La separación según el peso molecular se realizó empleando geles PAGE-SDS al 12,5%. Tras la electroforesis, los geles se tiñeron con nitrato de plata (Shevchenko y cols., 1996) y se analizaron empleando el programa informático ImageMaster v3.01 software (Pharmacia Biotech) y mediante inspección visual.

3.2.4.3 Transferencia de Western

Tanto la transferencia como el revelado del Western se realizaron por métodos descritos previamente (Renart y cols., 1996). Las proteínas de los extractos totales y de membrana externa, separadas en geles de PAGE-SDS, se transfirieron a membranas de Immobilon-P (Millipore) por el método semiseco en el Trans-Blot SD Semi -Dry Transfer Cell (BioRad). Las membranas se tiñeron con Rojo Ponceau (0,1 %) para evaluar la cantidad de proteína transferida. Tras desteñir, las membranas se bloquearon toda la noche en la solución de incubación con 2% (p/v) de leche descremada en polvo. A continuación se añadió el suero anti-Omp54 (apartado 3.2.5) a una dilución final de 1:2.000 en la misma solución de bloqueo y se dejó incubando 1 hora. El revelado de la membrana se realizó empleando la enzima peroxidasa conjugada a la proteína A (0.25 µg/ml), seguida por una detección luminométrica de la señal (Renart y cols., 1996).

3.2.4.4 Análisis por espectrometría de masas de los fragmentos generados por digestión triptica de Omp54

Este análisis se realizó en el Servicio de Proteómica del CNB. La digestión con tripsina en gel de la banda electroforética correspondiente a Omp54 se realizó según descrito previamente (Shevchenko y cols., 1996). El análisis de los fragmentos de digestión por espectrometría de masas se realizó en el espectrómetro de masas Bruker Reflex III MALDI-TOF (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Alemania) equipado con la fuente SOURCE en el modo reflector de ion positivo. El voltaje de aceleración iónica fue de 20 kV.

3.2.5 Producción de suero policlonal anti-Omp54

Se cultivó a 37°C la cepa *S. maltophilia* D457R, que sobreexpresa la proteína de membrana externa Omp54 en 12 litros de medio LB utilizando un fermentador Biostat (B. Braun-Biotech). La suspensión bacteriana se recogió a una D.O.₆₀₀ de 2,3 y se realizaron 3 lavados con el tampón fosfato magnesio. La mitad del sedimento celular se guardó a -20°C y la otra mitad se resuspendió en un volumen final de 120 ml de tampón fosfato magnesio. A partir de esta suspensión celular procedimos a la extracción de la membrana externa mediante el método de solubilización diferencial en Triton X-100 descrito en el punto 3.2.3. A partir de geles preparativos de PAGE-SDS al 10%, cortamos la banda correspondiente a Omp54 y procedimos a triturar los trozos de gel en presencia de N₂ líquido hasta obtener un polvo fino.

Este se resuspendió en 6 ml de PBS al 50% y una vez valorada la concentración de proteínas con el kit BCA (Pierce) ajustamos la concentración de Omp54 a un valor de 100 µg/ml.

Las inoculaciones y posteriores extracciones de sangre fueron realizados en el Servicio de Animalario del CNB. Como control para ensayos posteriores se extrajo suero preimmune de la arteria central de la oreja de un conejo New Zealand White de 2,5 kg. Aproximadamente 100 µg de Omp54 se mezclaron en una relación 1:1 con adjuvante completo de Freund (Sigma) y se inyectaron subcutáneamente en el conejo. Se realizaron otras 3 inyecciones subcutáneas con 2 semanas de intervalo entre cada inyección. En este caso, para cada inyección se mezclaron 100 µg de Omp54 con adjuvante incompleto de Freund (1:1). 2 semanas después de la última inyección se extrajo sangre de la arteria central de la oreja. El suero se alicuotó y se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.2.6 Purificación de ácidos nucleicos

3.2.6.1 Preparación de ADN cromosómico

Se realizó según está previamente descrito (Bagdasarian y Bagdasarian, 1994). La pureza y concentración del ADN se determinó midiendo la absorbancia a 260nm y 280nm y por análisis electroforético en geles de agarosa tal y como se describe en el apartado 3.2.7.

3.2.6.2 Preparación de ADN plasmídico

Se realizó mediante el método de lisis alcalina descrito con anterioridad (Sambrook y cols., 1989). Para la preparación de cósmidos se empleó el mismo método con algunas modificaciones, se redujo el tiempo de incubación en la Solución II de 5 min a 3 min y siempre en agitación suave. La pureza y concentración del ADN se determinó como se indica en el apartado 3.2.6.1.

3.2.6.3 Preparación de ARN

La extracción de ARN se realizó empleando el kit TriReagent-LS (Molecular Research Center Inc.) que contiene tiocianato de guanidina. El ADN residual se eliminó por tratamiento con ADNasa libre de ARNasa (Boehringer Mannheim) a 37°C durante 15 min. A continuación se hicieron 2 extracciones con fenol ácido y el ARN se precipitó con etanol. Una vez seco, el precipitado se resuspendió en agua destilada. La pureza y concentración del ARN se determinó midiendo la absorbancia a 260nm y 280nm y por análisis electroforético en geles de en condiciones desnaturizantes, tal y como se describe en el apartado 3.2.7.

3.2.7 Electroforesis en geles de agarosa

Las preparaciones de ADN se analizaron por electroforesis en geles de agarosa del 0,6 -1,0% conteniendo bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml en el tampón

TAE 1x (Sambrook y cols., 1989). El ARN se analizó electroforéticamente en geles de agarosa al 1% y en tampón MOPS al 1% en condiciones desnaturalizantes (formaldehído/formamida) según descrito previamente (Sambrook y cols., 1989). En ambos casos, se utilizaron marcadores comerciales de los tamaños adecuados.

3.2.8 Manipulación de ácidos nucleicos

3.2.8.1 Digestión enzimática

El tratamiento de ADN con endonucleasas de restricción se realizó en las condiciones recomendadas por la casa MBI Fermentas suministradora de las enzimas. Las enzimas de restricción empleadas fueron *Bsp*1431, *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III y *Pst*I.

3.2.8.2 Ligación de fragmentos de restricción

Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa y los fragmentos de interés se purificaron de la agarosa empleando el kit PrepAGene (BioRad). El subclonaje de los fragmentos en los vectores pUC19 y pCK01 (Tabla 3) se realizó por los métodos convencionales (Sambrook y cols., 1989) empleando T4 ADN ligasa (Boehringer Mannheim) para la ligación.

3.2.8.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN se realizó por PCR (Saiki y cols., 1988) en un termociclador automático (Perkin Elmer). La mezcla de reacción se preparó en un volumen final de 50 µl y estaba compuesta por 100 ng de ADN molde, 0,2 mM de cada uno de los deoxinucleótidos dATP, dCTP, dGTP y dTTP (Amersham), 0,5 µM de cada oligonucleótido, MgCl₂ 1,5 mM, Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM y 1 U de *Taq* ADN polimerasa (Amersham). En el caso de que el producto de PCR se emplease para secuenciar se utilizó 1 U de *Vent* ADN polimerasa (BioLabs). A la mezcla de reacción se le añadió una gota de aceite mineral para evitar la evaporación durante el proceso de amplificación. La amplificación se realizó empleando el siguiente programa: 1 ciclo de desnaturalización a 90 s a 94°C, 35 ciclos de 30 s a 94°C, un período de anillamiento de 60 s a 50-65°C dependiendo de los oligonucleótidos, un período de elongación de 90 s a 72°C y finalizando 1 ciclo de elongación de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR se analizaron en geles de agarosa a distintas concentraciones.

3.2.8.4 Transcripción reversa-PCR (RT-PCR)

Se realizó en 2 pasos, primero se procedió a la síntesis de ADN complementario (ADNc) por transcripción reversa a partir de ARN total (Sambrook y cols., 1989) y a continuación mediante PCR se amplificó una zona interna del ADNc. Para la síntesis de ADNc se incubaron 5 µg de ARN total con 50 pmoles del oligonucleótido sme2 durante 5

min a 65°C y a continuación se guardó en hielo. A la mezcla del paso anterior se añadió 0,2 mM de cada deoxinucleótido, 1x tampón de reacción y 1.0 unidad de transcriptasa reversa (AMV-RT, Promega) en un volumen final de 50 µl y se incubó durante 1 h a 42°C. Para inactivar la AMV-RT, la reacción se incubó durante 2 min a 94°C. La amplificación de ADNc se llevo a cabo por PCR según el protocolo descrito en el punto x utilizando los oligonucleótidos sme1 y sme2, la temperatura de anillamiento empleada fue de 58°C. Como control, se realizó en paralelo para cada muestra de ARN una reacción en ausencia de AMV-RT.

3.2.9 Construcción de genotecas de *S. maltophilia* D457R

Con el fin de clonar el sistema de multirresistencia expresado en *S. maltophilia* D457R se han construido genotecas genómicas en el plásmido pUC19 (Sambrook y cols., 1989) y en el cósmido pLAFR3 (Staskawicz y cols., 1987). Los cósmidos son plásmidos modificados que llevan una copia de la secuencia de ADN (secuencias *cos*) que permite el empaquetamiento de ADN dentro del bacteriófago λ. También llevan un marcador antibiótico y un origen de replicación que permite la introducción de estos vectores en bacterias y su propagación como plásmidos. Otra característica importante de estos vectores es que permiten insertos de hasta 40 kpb. El cósmido pLAFR3 permite insertos de 20 a 30 kpb, es de bajo número de copias (5 copias por bacteria), lleva como marcador el gen de resistencia a la tetraciclina y se propaga en *E. coli*. A continuación se describe en detalle los pasos realizados en la construcción de la genoteca genómica de *S. maltophilia* D457R en pUC19 y en pLAFR3.

3.2.9.1 Estrategia de ligación

Los vectores pUC19 y pLAFR3 se trataron con el enzima de restricción *Bam*HI y con fosfatasa alcalina (MBI Fermentas) siguiendo las recomendaciones de la casa fabricante. El ADN genómico de la cepa *S. maltophilia* D457R se sometió a una digestión parcial con el enzima de restricción *Bsp*1431 y a continuación los productos de la digestión se separaron en un gradiente de sacarosa del 10-40% (Sambrook y cols., 1989). Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se analizaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 0,5%. Las fracciones que contenían fragmentos de ADN de aproximadamente 5 a 9 kpb se emplearon en la reacción de ligación con el pUC19 linearizado. Mientras que en la reacción de ligación con el cósmido pLAFR3, se utilizaron las fracciones que contenían fragmentos de 20 a 30 kpb. En este caso, a la mezcla de ligación se añadieron aproximadamente 2,5 µg del cósmido linearizado y del ADN cromosómico. Las reacciones de ligación se incubaron a 15°C durante 16 horas en el caso del pUC19 y durante 48 horas en caso del cósmido. Tras este tiempo, las reacciones de ligación se analizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,5%. La mezcla de ligación con el pUC19 se empleó para electroporar (apartado 3.2.11) *E. coli* KZM120 (Tabla

2), esta cepa contiene un gen de resistencia a kanamicina que sustituye a los genes *acrAB*. Estos genes codifican para las proteínas AcrA y AcrB implicados en el eflujo de diversos compuestos, entre ellos antibióticos, hacia el exterior celular. En la Tabla 5 podemos ver que *E. coli* KZM120 presenta un fenotipo de hipersensibilidad con respecto al salvaje K4401. Por lo tanto, *E. coli* KZM120 es un buen hospedador para clonar por complementación la resistencia que confieren los sistemas de eflujo. A continuación se describe el empaquetamiento de la ligación con pLAFR3 en el bacteriófago λ y la posterior infección en cepas de *E. coli*.

3.2.9.2 Empaquetamiento en el bacteriófago λ

La cabeza del bacteriófago λ permite el empaquetamiento de fragmentos de ADN de 33 a 52 kpb. Pusimos en contacto la reacción de ligación que contenía el cósmido con una mezcla de empaquetamiento de fagos (λ -DNA *in vitro* packaging module RPN 1717, Amersham). Tras un determinado tiempo de incubación y siguiendo las instrucciones de casa fabricante, el ADN se introdujo en las cabezas del bacteriófago λ .

3.2.9.3 Infección en *E. coli*

Se han construido dos genotecas genómicas-pLAFR3 en sendas cepas de *E. coli*: HB101 y AA81 (Tabla 2). Entre sus características más importantes están su capacidad de infección por el bacteriófago λ y la no recombinación de ADN exógeno con su ADN cromosómico. Para ambas cepas, la infección se realizó en medio LB suplementado con 0,4% de maltosa y 100 mM de SO_4Mg siguiendo las instrucciones del kit de empaquetamiento *in vitro* RPN 1717 (Amersham). En el caso de *E. coli* HB101 la genoteca se sembró en placas de LB agar con tetraciclina (13 $\mu\text{g/ml}$) y las placas se incubaron a 37°C. Una vez crecidas, las colonias se recogieron con tampón PBS y 20% de glicerol, se alicuotaron y se guardaron a -80°C. En el caso de *E. coli* AA81, se realizó una selección directa de transformantes que complementarían la susceptibilidad a eritromicina. Para ello, la genoteca se sembró en placas de LB agar suplementado con tetraciclina (13 $\mu\text{g/ml}$), kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$) y eritromicina (9 $\mu\text{g/ml}$). Las placas se incubaron a 37°C y las colonias resistentes a los antibióticos de selección se recogieron para su posterior caracterización.

3.2.10 Transducción con fagos P1

Para inactivar el sistema *acrAB* en *E. coli* LE392 y TG1 (Tabla 2) se empleó el método de transducción de P1 descrito previamente (Goldberg y cols., 1974). A partir de KZM120 (Tabla 2), que contiene un gen de resistencia a kanamicina en sustitución de los genes *acrAB*, se prepararon lisados de fago y estos se utilizaron para infectar las dos cepas arriba mencionadas seleccionando con kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$). La inactivación del gen *acrAB* se comprobó mediante la determinación de las CMI's a diversos antibióticos.

3.2.11 Transformación

La introducción de vectores en cepas de *E. coli* se realizó mediante electroporación (Miller, 1994) y selección con los antibióticos apropiados.

3.2.12 Movilización de cósmidos

La transferencia de cósmidos entre cepas de *E. coli* se realizó mediante conjugación tripartita (de Lorenzo y Timmis, 1994). Las cepas donadora y receptora se pusieron en contacto con la cepa auxiliar *E. coli* HB101 (pRK2013) en una proporción 1:1:1 en 2 ml MgSO_4 10 mM. La suspensión se pasó por un filtro de nitrocelulosa de 0,45 de diámetro de poro (Millipore) y éste se colocó sobre medio LB agar. Tras 6 horas de incubación a 37°C el filtro se recuperó y se lavó con 5 ml de MgSO_4 10 mM. A continuación se sembraron diluciones en tampón PBS de esta suspensión en LB agar suplementado con los antibióticos apropiados para la selección.

3.2.13 Secuenciación de ADN

La secuenciación se realizó en el Servicio de Secuenciación del CNB mediante el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos descrito con anterioridad (Sanger y cols., 1977). Los plásmidos recombinantes derivados de pUC19 se secuenciaron empleando los oligonucleótidos universales M13 directo y reverso (Sambrook y cols., 1989). Las dos hebras de ADN de los insertos contenidos en las construcciones pUCE2 y pERY1 y del inserto A5 se secuenciaron utilizando cebadores internos. Los oligonucleótidos empleados se muestran en la Tabla 4. Los cromatogramas generados por el secuenciador automático ABI 373A fueron interpretados con el programa informático EditView 1.0. En el caso de ambigüedades, los cromatogramas se interpretaron visualmente.

3.2.14 Análisis de las secuencias

Las secuencias obtenidas fueron ensambladas empleando el programa informático GeneJockey 2.0. La identificación de marcos de lectura abierta (ORFs) se realizó con el programa CodonPreference del paquete informático GCG (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.) empleando la tabla de utilización de codones de *E. coli*. Las búsquedas en las bases de datos EMBL y SwissProt se realizaron con el programa FASTA del GCG y BLAST del SIB (Swisse Institute of Bioinformatics).

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados a lo largo de este trabajo.

Construcción pUCE2 e inserto A5	Secuencia 5' → 3'
sme1	CCA AGA GCC TTT CCG TCA T
sme2	TCT CGG ACT TCA GCG TGA C
sme5	CAG CGT GAC CAC GGT GAC GTC
sme6	CGA ACA AGG CCG CCA CGA TG
sme7	GAG GAA GGG CTG TCG CCG C
sme8	GCG CCA GCA GCT GCG GTT C
sme9	CGC GTG GCT GAC CTA TGG
sme10	GCC AAG GCC TCG CTG GAT GCG
sme11	GCT GAT GGC GCT GGT GCA GG
sme12	CCG ATA CCC ACC AGC GCA CC
sme13	GCT GCC GGA CAG CAT CGA AC
sme14	CGA GGT TCA GCC GCT GCG
sme15	CAG CCG CAC GGT TCG GCG
sme16	GCA CTT CGA CCT TGT TGT CC
sme18	CGA TCA CCT GCT GCA GGC
sme19	CCA GGT GGG ATT CCG CGA
sme20	CGA TCC GCG TTG GCG ATG
sme21	CTC CAA CAG CTC GTC CAA C
sme22	GGA GGA GAA GTA GAT CAG GC
sme23	CGA CCT CGC TGG GAC TTG
sme24	AGG CCG AGC AGC TGG TTC
sme25	CGA TCA TGC CGC CGA GCA C
sme26	TCG GCG GCA TGA TCG TCG
sme27	TGC CAG CGA CAG TGC AAA GGG TC
sme28	GCC AGG GTG ACC CGC CAG
sme29	CGG CGT GCT CGG CGG CAT
sme30	CGC TGG AAG ACA TGA AGG GC
sme31	CCG CAG GCA GCA AGA AGC
sme32	GCC AAC CGC ATC ACC CTG
sme33	GCC AAC CGC ATC ACC CTG
sme34	GGA GAT GAT CGG TGC CCG CGC
sme35	GCT GAA GCC CTG CAC GCA G
sme36	GAA GCT GGG GAC CGC CT
sme37	GAC GAT CAT GCC GCC GAG
sme38	GTC CAA CCT GTT CGA CAG CG
sme39	GCA CGG TGG CGT GCT GCA
sme40	GGG AAT GAT GGG TGC GAA
sme41	CGA AAA TCG CCG CGC GCA GCA TG
sme42	GTG AAA GCC CGC AGA TCG
sme43	CCA GGA TCA TCG ATC TGC C
Construcción pERY	
ery1	CCA ACC TCA AAC AAT CTC ATT G
ery2	GCT GCG GGT TTA CCT GTA AG
ery2dsp2	TGC AGT AAG ACT CAG TCG

(continuación Tabla 4)

erydsp2	ATC	TAC	GGA	TTT	TCG	CCA
ery1b2	GCT	TCT	TCA	ACA	AGA	TGA
ery1rsp2	TGA	AGC	AAC	CCA	CTC	CGA
ery1rsp3	GGC	GTA	TGA	AAC	GAT	GGC
ery1b3	AAT	GAA	TAT	CCG	CCA	ATT
ery1b4	CAT	CCT	GAC	ACA	GAG	CGT
ery1rsp4	CCA	ATG	ATT	GTT	GGC	TAT
ery2a	GCT	CAA	TGA	GGT	TAT	TCA
ery1b5	GTC	TGT	CTT	GTT	ATA	TTC
ery1rsp5	GAA	TTA	AAC	ACG	ATA	ATG
ery1b6	CAA	CAC	CAA	ACG	TTT	TTA

3.2.15 Hibridación con sondas de ADN

3.2.15.1 Transferencia de Southern

La transferencia de fragmentos de restricción desde geles de agarosa a membranas de Nylon (Amersham) se realizó por capilaridad según el método descrito por (Southern, 1975). Una vez transferido, el ADN se fijó a la membrana por exposición a ultravioleta durante 2 min. Las membranas de Southern se guardaron secas a 4°C hasta su utilización.

Para analizar mediante Southern las genotecas, se utilizó el método de transferencia a Nylon, lisis, neutralización y renaturalización descrito con anterioridad (Sambrook y cols., 1989). La genoteca pLAFR3-ADN cromosómico de *S. maltophilia* D457R construida en *E. coli* HB101 (ver apartado 3.2.9.3) se sembró en 2 placas de 13,5 cm con aproximadamente 1.500 colonias por placa. Las placas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 8 h. Una vez realizada la transferencia a membranas de Nylon por duplicado y la fijación del ADN por exposición a UV durante 2 minutos, las membranas de Southern se guardaron secas a 4°C hasta su utilización.

3.2.15.2 Transferencia de Northern

La transferencia de ARN a membranas de Nylon (Amersham) se realizó según el método descrito previamente (Alwine y cols., 1977). Muestras de 25 µg de ARN se sometieron a electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón MOPS al 1% bajo condiciones desnaturalizantes (en presencia de formaldehído y formamida). Como marcador de peso molecular se utilizó el RNA Molecular Weight Marker I (Boehringer Mannheim). El ARN se transfirió a membranas de Nylon por capilaridad según el método descrito con anterioridad (Southern, 1975). La fijación también se hizo por exposición a UV durante 2 minutos. Para verificar la carga de las muestras las membranas se tiñeron con una solución

de azul de metileno 0,02% y acetato sódico 0,3 M pH 5,2. A continuación las membranas se lavaron con agua destilada, se secaron a temperatura ambiente y se guardaron a 4°C hasta su utilización.

3.2.15.3 Marcaje radioactivo de sondas de ADN

Las sondas empleadas en los análisis de Southern y de Northern se prepararon por PCR según se ha descrito en el punto 3.2.8.3. En la mezcla de reacción se empleó 100 ng de pAS1 como ADN molde, se sustituyó el dATP por 0,32 mM (α -³²P)dATP (50 μ Ci) y la temperatura de anillamiento fue de 58°C. Se emplearon los oligonucleótidos sme1 y sme2 para amplificar una región de 150 pb del gen *smeD*. Los productos de la PCR se purificaron empleando las columnas cromatográficas Micro Bio-Spin (BioRad) siguiendo las instrucciones de la casa fabricante. La radioactividad de las sondas se cuantificó en un contador de centelleo Wallac 1410.

3.2.15.4 Hibridación

Se siguió el método descrito previamente (Sambrook y cols., 1989). Las membranas de Southern y de Northern se incubaron en la solución de prehibridación durante 1 h a 55°C. A continuación se añadió la sonda de ADN radioactiva desnaturalizada a una concentración final de 10⁶ cpm/ml y se incubó durante toda la noche a 55°C. Posteriormente, para eliminar la unión inespecífica de la sonda se realizaron 3 lavados de 15 minutos a 55°C con la solución de lavado A y otros 3 en las mismas condiciones con la solución de lavado B. Para visualizar la hibridación, las membranas se pusieron en contacto con una película radiográfica el tiempo necesario.

3.2.16 Determinación del tamaño celular

3.2.16.1 Observación al microscopio

El análisis de la morfología celular de *S. maltophilia* D457 y de D457R se realizó a partir de suspensiones celulares obtenidas de cultivos crecidos en LB a 37°C hasta su fase exponencial (D.O.₆₀₀ entre 0,4 y 0,5). Las preparaciones se realizaron según está descrito previamente (Donachie y cols., 1976). Las suspensiones bacterianas se concentraron por centrifugación en 1/10 del volumen inicial y se fijaron a portaobjetos que contenían una película de agar al 1%, cloruro sódico al 0,9% y azida sódica al 0,1%. Las imágenes de las bacterias se obtuvieron con una cámara CCD (Sensys) acoplada un microscopio Leica DMRB utilizando óptica de contraste de fases.

3.2.16.2 Distribución de tamaños con el contador y canalizador de Coutler

Para conocer la distribución de tamaños a lo largo de la curva de crecimiento se empleó un contador de Coutler (modelo ZM) conectado a un canalizador de Coutler 256. En

éstos, la suspensión celular pasa al interior de una sonda a través de un orificio de 30 µm de diámetro de poro. Este orificio cierra un circuito eléctrico establecido entre un electrodo del interior y otro del exterior del tubo. Los cambios de conductividad registrados por el canalizador son proporcionales a la distribución de tamaños (volumen relativo) de la población celular de la muestra. Muestras de 1 ml de cultivos de *S. maltophilia* D457 y de D457R obtenidas en distintas fases de crecimiento se fijaron añadiendo 25 µl de formaldehído al 3,7% (v/v). Las muestras se guardaron a 4°C y justo antes de aplicarlas en el contador de Coutler se diluyeron 100 en una solución libre de partículas (Isoton). La distribución de los volúmenes celulares de 1000 partículas de cada muestra es registrado de forma automática en forma de histograma. En éste, el volumen celular de cada una de las 1000 partículas se representa según valores relativos de tamaños. Como valor representativo de cada muestra se ha tomado la mediana, es decir el volumen relativo en el cual la mitad de la población de la muestra se encuentra por encima de ese valor y la otra mitad por debajo de ese valor.

3.2.17 Cuantificación de ATP y ADP

La determinación de las concentraciones de ATP y ADP en suspensiones bacterianas se realizó empleando el ATP Bioluminescence Assay Kit CLSII (Boehringer Mannheim). El método se basa en la dependencia de ATP de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis*, la emisión de luz en la oxidación de D-luciferina a oxiluciferina catalizada por la luciferasa es proporcional a la concentración de ATP en la muestra. La lisis celular se realizó según el método descrito en el Kit CLSII, se añadió 900 µl de tampón de lisis precalentado a 100°C a 100 µl de cultivos de *S. maltophilia* D457 y D457R en fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,4) y fase estacionaria (D.O.₆₀₀ de 2,0). Tras 2 min a 100°C, la suspensión celular se centrifugó y los sobrenadantes se recuperaron y se guardaron a -20°C hasta su utilización. En paralelo se determinó la concentración de proteínas en cada cultivo mediante el kit BCA (Pierce) empleando seroalbúmina bovina como estándar. Para cuantificar la concentración de ADP de las muestras, se realizó una reacción en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP, Sigma) y de la enzima piruvato quinasa (PK, Boehringer Mannheim) siguiendo el método descrito previamente (Lundin y cols., 1986). La reacción se describe a continuación:

PK

ADP (contenido en la muestra) + PEP → ATP + piruvato

Las determinaciones se realizaron en un Luminómetro para Microplacas LB 96V (Berthold) de forma automatizada, tal como se describe a continuación:

- determinación ATP: 50 µl muestra + 50 µl reactivo luciferasa.
- determinación ATP + ADP: 45 µl muestra + 5 µl mezcla PK-PEP + 50 µl reactivo luciferasa.

-blanco ATP: 50 μ l tampón + 50 μ l reactivo luciferasa.

-blanco ATP + ADP: 45 μ l tampón + 5 μ l mezcla PK-PEP + 50 μ l reactivo luciferasa.

Como control para confirmar que el ATP y ADP se había agotado se añadió a cada una de las muestras cada adenosín fosfato a una concentración final de 0.05 μ M y se midió la emisión de luz. A partir de los valores de emisión de luz se determinaron las concentraciones de ATP y ATP+ADP en base a la emisión de luz de muestras de concentraciones conocidas de ATP y ADP. La concentración de ATP y ADP en cada condición de cultivo se expresa en moles/mg proteína y son la media de 3 muestras.

4. Resultados

S. maltophilia es intrínsecamente resistente a muchos antibióticos, sin embargo, tal y como se indica en la Introducción, los niveles de resistencia podrían incrementarse como consecuencia de la sobreexpresión de sistemas de bombeo múltiple de drogas. A lo largo de la presente tesis, denominaremos mutantes multirresistentes a aquéllos en los cuales se observe un aumento concomitante en las CMI de antibióticos pertenecientes a distintas familias estructurales.

4.1 Obtención de *S. maltophilia* D457R

La estrategia adoptada para la obtención de mutantes multirresistentes de *S. maltophilia*, ha sido la selección de mutantes espontáneos resistentes a tetraciclina a partir de un aislado clínico sensible. Esta selección se ha utilizado con éxito en otros casos (Cohen y cols., 1989). En nuestro caso, empleamos esta estrategia debido a los resultados observados en experimentos de transposición utilizando un transposon miniTn5Tc (de Lorenzo y cols., 1990) en el aislado clínico *S. maltophilia* D457 que se estaba llevando a cabo en nuestro laboratorio. En estos estudios la aparición de colonias en el medio de selección no se debía a la inserción del transposon miniTn5Tc que lleva como marcador el gen de resistencia a la tetraciclina, sino a la aparición de mutantes resistentes al antibiótico a una elevada frecuencia ($1,9 \times 10^{-6}$). De una placa de selección con tetraciclina, se aislaron distintas colonias y se determinaron las CMI a diversos compuestos con el fin de analizar si la cepas resistentes presentaban un fenotipo de multirresistencia. Debido a que los valores de CMI para los distintos mutantes eran iguales, se escogió uno de ellos al azar para los estudios posteriores. A este se denominó *S. maltophilia* D457R.

4.1.1 Fenotipo de multirresistencia

En la Tabla 5 se muestran las CMI para los aislados *S. maltophilia* D457 y su derivado D457R. Destaca que la cepa *S. maltophilia* D457R no sólo presenta una CMI más alta para la tetraciclina (el agente de selección), sino también para el cloranfenicol, la eritromicina y las quinolonas. Además, los niveles de resistencia para estos compuestos han aumentado más que para la tetraciclina. En este sentido, los aumentos en las CMI son de 2,7 veces para la tetraciclina, 8 para el cloranfenicol, más de 5 para la eritromicina y más de 10 veces para las quinolonas. Por otro lado, no se detectan diferencias significativas en las CMI para el aminoglicósido amikacina, para la combinación de ticarcilina-ácido clavulánico y para el β -lactámico imipenem. Con estos datos podemos decir que la cepa *S. maltophilia* D457R ha adquirido un fenotipo de multirresistencia.

Tabla 5. Valores de CMI_s (µg/ml) de diversos compuestos para cepas de *S. maltophilia* y *E. coli*.

<i>S. maltophilia</i>	Tc	Cm	Ak	Ip	TI-Cv	Em	Nl	Cx	Nx	Ox	BrEt ^a
D457	6	1,5	24	200 ^a	4	48-64	8	0,75	6	3	500
D457R	16	12	16	200 ^a	6	>256	128	16	64	>32	500
C047	16	16	4	>32	32	>256	16	-	12	1,5	-
C048	4	1,5	6	250 ^a	0,75	128	12	0,38	3	2	-
C357	32	96	4	250 ^a	24	>256	128	>32	256	>32	-
D388	16	12	96	>32	32	96	8	2	8	2	-
E301	12	4	3	>32	16	128	12	-	3	1,0	-
E539	8	4	>256	>32	32	96	12	2	4	2	-
E729	32	16	16	150 ^a	1	256	32	>32	>256	8	-
E759	16	16	24	250 ^a	>256	>256	12	2	8	4	-
E824	4	8	16	>32	4	192	3	0,38	2	0,38	-
E847	4	0,75	48	150 ^a	0,75	32	8	0,5	3	2	-
E923	12	64	12	>32	96	>256	16	-	16	3	-
E999	12	12	256	>32	8	>256	16	-	8	3	-
F227	4	4	24	>32	48	16	4	-	3	0,38	-
F375	12	16	128	>32	16	>256	128	12	32	16	-
F861	3	2	32	>32	96	24	4	>32	2	0,5	-
G51	6	3	12	>32	192	96	16	0,5	2	1	-
<i>E. coli</i>	Tc	Cm	Ak	Ip	TI-Cv	Em	Nl	Cx	Nx	Cx	BrEt
K4401	1,0	4	-	-	-	32	-	-	-	0,064	-
KZM120	0,19	0,5	-	-	-	2,0	-	-	-	0,008	-
LE392	1,0	4	-	-	-	32-48	-	-	-	0,064	-
AA81	0,19	0,5	-	-	-	3	-	-	-	0,016	-
TG1	1,0	6	-	-	-	16	-	-	-	0,094	-
AA72	0,25	0,75	-	-	-	1,5	-	-	-	0,008	-
KZM120 (pERY)	0,019	0,25	-	-	-	32	-	-	-	0,008	-
AA68	-	0,38	0,50	0,125	0,50	1,0	1,0	-	<0,016	0,008	3,9
AA68 (pAS1)	-	6	0,50	0,125	0,38	>256	6	-	0,032	0,047	125
AA72 (pCK01)	0,38	-	0,19	0,094	1,0	1,5-2	1,0	-	<0,016	0,012	-
AA72 (pAS2)	1,0	-	0,19	0,19	0,75	32-48	3,0	-	0,032	0,064	-

^a CMI determinada por el método de dilución en placa multi-pocillos.

Tc, tetraciclina; Cm, cloranfenicol; Ak, amikacina; Ip, imipenem; TI-Cv, ticarcilina-ácido clavulánico; Em, eritromicina; Nl, ácido nalidíxico; Cx, ciprofloxacina; Nx, norfloxacina; Ox, ofloxacina; BrEt, bromuro de etidio.

4.1.2 Expresión de una nueva proteína en la membrana externa de *S. maltophilia* D457R

El fenotipo de multirresistencia de diversos microorganismos se ha asociado a la sobreexpresión de proteínas de membrana externa (Rella y Haas, 1982; Masuda y cols., 1996). Estas proteínas están formando parte de los sistemas de bombeo de antibióticos que se encuentran sobreexpresados en los aislados multirresistentes (Nikaido, 1998). Teniendo en cuenta esto, se procedió al análisis electroforético de proteínas de membrana externa de los aislados *S. maltophilia* D457 y su derivado multirresistente D457R. En la Figura 3 se muestra el perfil de proteínas obtenido tras la tinción de un gel de PAGE-SDS al 10%. En el carril correspondiente a la membrana externa de *S. maltophilia* D457R se observa una banda de aproximadamente 54 kDa que no aparece en las muestras de *S. maltophilia* D457. Esta proteína presenta un tamaño equivalente al descrito para otras proteínas de membrana externa implicadas en los sistemas de bombeo de bacterias Gram-negativas, que están en el rango de 50 a 56 kDa. Denominamos a esta nueva proteína Omp54.

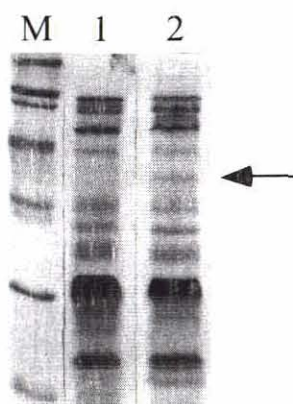


Figura 3. Análisis electroforético (PAGE-SDS 10%) de proteínas de membrana externa de *S. maltophilia* D457 (1) y su derivado multirresistente D457R (2). Cada carril contiene 10 µg de proteína. La flecha señala Omp54. M, marcadores de peso molecular, de arriba abajo: 200, 116, 97, 66, 45, 31 y 22 kDa.

4.1.3 Acumulación intracelular de [3 H]tetraciclina, quinolonas y bromuro de etidio en *S. maltophilia* D457 y D457R

Los sistemas de bombeo de compuestos tóxicos en microorganismos Gram-negativos generalmente están acoplados al gradiente de protones de la membrana (Paulsen y cols., 1996). En presencia de un desacoplante del gradiente de H^+ , el sistema de bombeo sería incapaz de transportar el sustrato hacia el exterior y se daría una acumulación de éste en el

citoplasma. Para verificar la presencia de bombas activas, se procedió a realizar ensayos de acumulación de diversos compuestos en presencia y en ausencia del desacoplante de protones CCCP.

La Figura 4 (Panel A) muestra los datos de acumulación intracelular de [^3H]tetraciclina. El antibiótico se añadió a tiempo cero y se tomaron alícuotas por triplicado cada 5 min. A los 10 min de incubación se añadió CCCP a una concentración final de 100 μM . Se observa que a los 5 min ya se alcanza el nivel de saturación de la tetraciclina para las dos cepas y este se mantiene durante los 30 min del ensayo. La adición de CCCP en las muestras de *S. maltophilia* D457R conlleva un aumento significativo en los niveles de acumulación intracelular de tetraciclina. Este aumento se mantiene a lo largo del ensayo en presencia de CCCP. Sin embargo, la presencia de CCCP no produce un cambio significativo en los valores de acumulación del antibiótico en las muestras de *S. maltophilia* D457. Estos datos indican que la cepa multirresistente expresa un sistema de bombeo acoplado al gradiente de H^+ de la membrana responsable del transporte activo de tetraciclina. Por el contrario, este sistema no parece estar funcionando en la cepa salvaje D457.

Los resultados de acumulación de las quinolonas norfloxacin, ciprofloxacina y ofloxacina se muestran en la Figura 4 (Panel B). En este caso, cada quinolona se añadió a tiempo cero y, tras 10 min de incubación a 37°C, las suspensiones bacterianas se dividieron en dos. A cada una de estas mitades se añadió CCCP a una concentración final de 100 μM . Se dejaron incubando otros 10 min a 37°C y se recogieron 3 alícuotas de 0,5 ml. Tras el tratamiento descrito en el punto 3.2.2 se determinó la concentración de las quinolonas en cada muestra. Para los tres compuestos se observa que los niveles basales de acumulación son más altos en *S. maltophilia* D457 que en el derivado multirresistente D457R, una situación compatible con un bombeo más activo de estos antibióticos en el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R que en la cepa parental *S. maltophilia* D457. Los niveles de acumulación de las tres quinolonas aumentan considerablemente en presencia de CCCP. En el caso de la norfloxacin y ciprofloxacina los niveles de acumulación son bastante parecidos entre las dos cepas. Por el contrario, en presencia de CCCP se observa un nivel intracelular de ofloxacina bastante más elevado en *S. maltophilia* D457 que en el derivado multirresistente. Estos datos indican la presencia de sistemas de eflujo funcionales para quinolonas en los dos aislados.

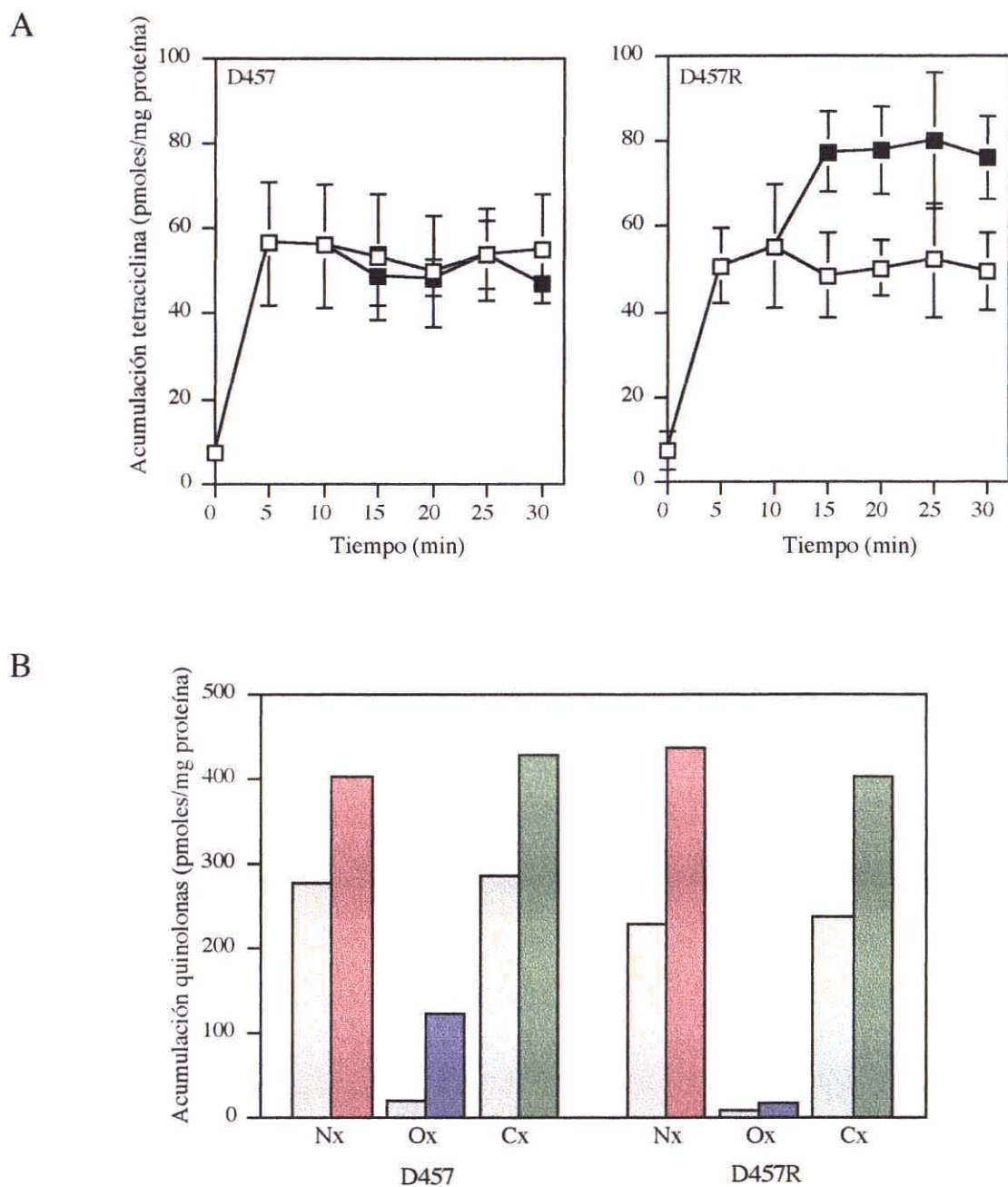
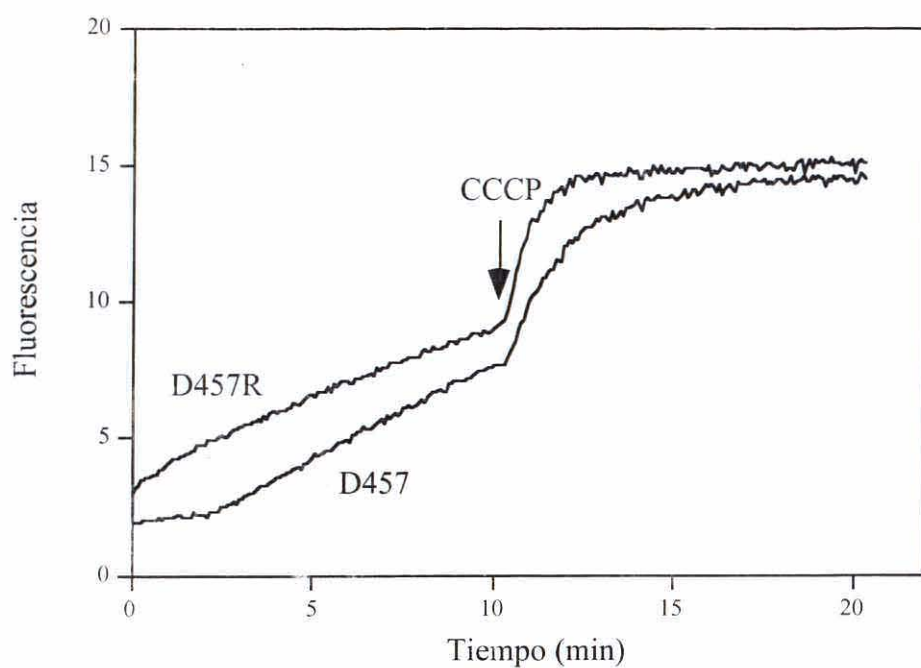


Figura 4. Acumulación intracelular de tetraciclina (panel A) y quinolonas (panel B) por *S. maltophilia* D457 y D457R. Los datos con fondo oscuro corresponden a muestras en presencia del inhibidor de la fuerza motriz de protones CCCP.

El ensayo de acumulación de bromuro de etidio permite el seguimiento de la acumulación del compuesto de forma continua. En el Panel A de la Figura 5 se muestran las curvas de acumulación para las dos cepas. Las suspensiones bacterianas de *S. maltophilia* D457 y D457R se incubaron 10 minutos en presencia de 10 µg/ml de bromuro de etidio. Tras este tiempo se añadió CCCP y se siguió la medida por otros 10 minutos. Se observa que el nivel basal de acumulación de bromuro de etidio en *S. maltophilia* D457 es inferior que en *S. maltophilia* D457R. Sin embargo, el seguimiento continuo parece indicar que la velocidad de acumulación es mayor en *S. maltophilia* D457 que en *S. maltophilia* D457R. La adición de CCCP conlleva al aumento en los niveles intracelulares de bromuro de etidio alcanzando al final valores similares en las dos cepas. Con el fin de conocer mejor la velocidad de acumulación de bromuro de etidio, se procedió a realizar otro ensayo. En este caso la entrada de bromuro de etidio se siguió durante 35 minutos y no se añadió CCCP. El resultado de este ensayo se muestra en el Panel B de la Figura 5. De nuevo se observa un nivel inicial de acumulación más bajo para *S. maltophilia* D457. Además, la diferencia en la velocidad de acumulación del compuesto es ahora más patente e incluso los niveles de acumulación de bromuro de etidio en la cepa silvestre sobrepasan los niveles de acumulación en el derivado multirresistente. Esta diferencia se mantiene hasta los 35 minutos que duró el ensayo. Los ensayos de acumulación de bromuro de etidio indican que el balance neto entre la entrada, posiblemente por difusión, y la salida por bombeo activo es distinta en las dos cepas. Una vez que se ha llegado al equilibrio entre la entrada y la salida del bromuro de etidio, se observa una acumulación intracelular neta más baja para el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R.

En su conjunto, los ensayos de acumulación con los distintos compuestos indican la existencia de bombas de extrusión activas tanto en *S. maltophilia* D457 como en su derivado multirresistente D457R. Sin embargo, para algunos sustratos, la actividad es mayor en el caso de *S. maltophilia* D457R que en la cepa silvestre *S. maltophilia* D457.

A



B

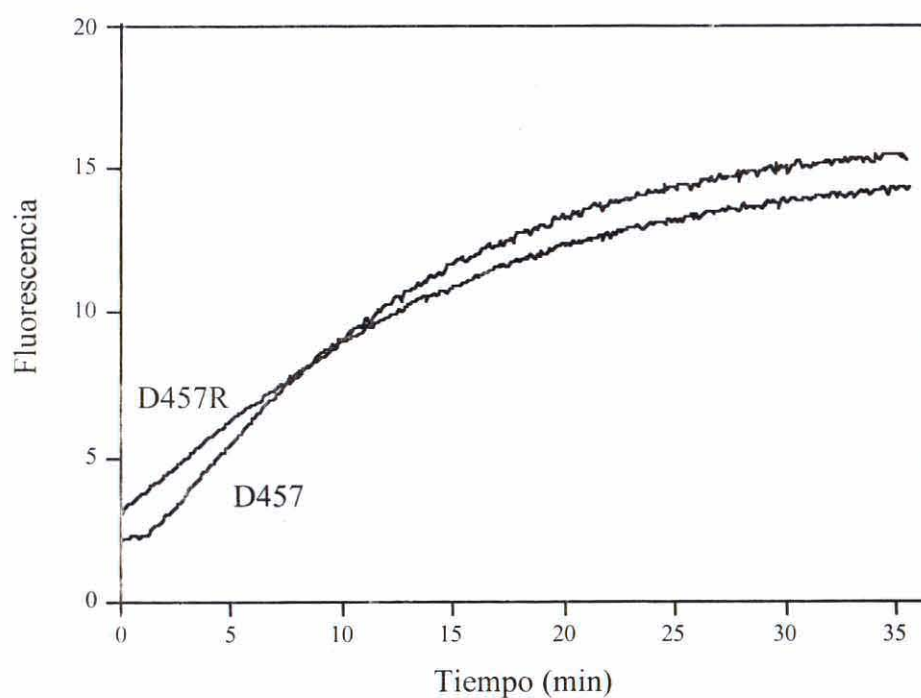


Figura 5. Acumulación intracelular de bromuro de etidio por *S. maltophilia* D457 y D457R. En el Panel A, se añadió CCCP a los cultivos celulares después de 10 minutos de empezar el ensayo; en el Panel B el ensayo se realizó en ausencia de CCCP y se siguió la entrada de bromuro de etidio durante 35 minutos.

4.2 Obtención de un anticuerpo policlonal contra Omp54

Con el fin de obtener un reactivo que nos permitiera estudiar con más detalle el papel de Omp54 en resistencia múltiple a antibióticos, tanto en aislados clínicos, como en mutantes de laboratorio, se procedió a obtener un anticuerpo policlonal capaz de reconocer esta proteína tal y como se describe en la sección 3.2.5. La especificidad del suero procedente del conejo inmunizado con Omp54, obtenido como está descrito en el punto 3.2.5, se comprobó por análisis de Western. Las proteínas de extractos celulares de *S. maltophilia* D457 y D457R y *E. coli* HB101 se separaron en geles PAGE-SDS al 8% (Panel A de la Figura 6).

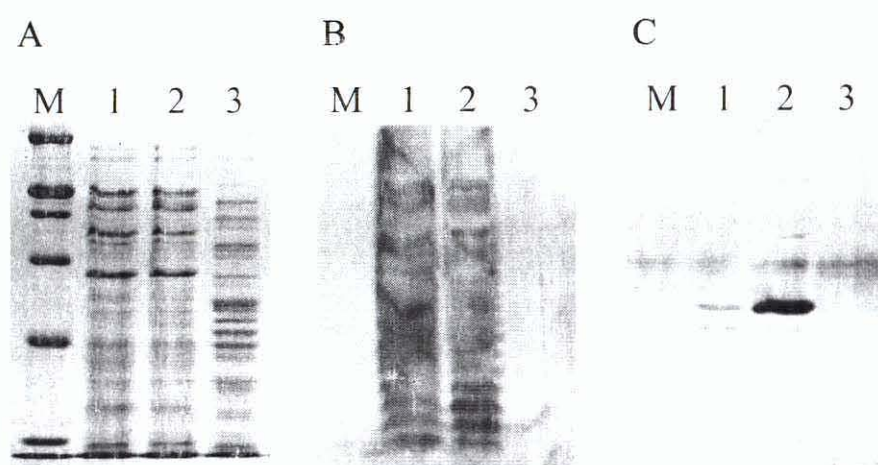


Figura 6. Análisis de la especificidad del suero policlonal anti-Omp54. Panel A, separación electroforética (PAGE-SDS 8%) de proteínas de los extractos celulares de *S. maltophilia* D457 (1) y D457R (2) y *E. coli* HB101 (3). Panel B, transferencia de Western e inmunodetección con suero original. Panel C, transferencia de Western e inmunodetección con suero tratado (ver texto). M, marcadores de peso molecular, de arriba abajo: 200, 116, 97, 66, 45 y 31 kDa.

El gel se transfirió a membranas de Nylon (tal y como se describe en el apartado 3.2.4.3) y se procedió a la inmunodetección de la proteína Omp54 con el suero policlonal. En la Figura 6 (Panel B) se observa que el suero total reacciona con el lipopolisacárido (LPS) presente en la muestras de extracto total de *S. maltophilia* D457 y D457R mientras que no reconoce el LPS de *E. coli* HB101. Para mejorar la especificidad del suero se procedió a realizar lavados del mismo con preparaciones de membrana externa de la cepa *S. maltophilia* D457. Para ello, se incubaron 35 ml de suero durante 48h a 4°C con una preparación de membrana externa

procedente de 50 ml de un cultivo en fase estacionaria de la cepa *S. maltophilia* D457. La mezcla se centrifugó a 40.000 xg para decantar las membranas y la especificidad del sobrenadante se comprobó por análisis de Western. En la Figura 6 (Panel C) se comprueba que el suero tratado es específico para Omp54 y determinamos que una dilución 1:2.000 es la apropiada para la realización de análisis de inmunodetección. Además se puede observar la presencia de Omp54 en la cepa *S. maltophilia* D457, aunque su expresión es mucho más baja que en el derivado multirresistente D457R.

4.3 Clonaje de un determinante de resistencia a eritromicina a partir de *S. maltophilia* D457R

Con el fin de clonar genes implicados en el fenotipo de multirresistencia de *S. maltophilia* D457R, se utilizó la genoteca genómica-pUC19 construida en *E. coli* KZM120 (ver apartado 3.2.9). El cromosoma de *E. coli* KZM120 contiene una inserción de un gen de resistencia a kanamicina en sustitución de los genes *acrAB* (Ma y cols., 1995). Estos genes codifican para las proteínas AcrA y AcrB implicados en el eflujo de antibióticos hacia el exterior celular (Ma y cols., 1993). En la Tabla 5 se observa que *E. coli* KZM120 presenta un fenotipo de hipersensibilidad con respecto a la cepa silvestre *E. coli* K4401. Por lo tanto, *E. coli* KZM120 es un buen hospedador para clonar por complementación la resistencia que confieren los sistemas de eflujo. Para ello, la genoteca se sembró en medio LB agar suplementado con ampicilina (200 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) y eritromicina (6 µg/ml). La concentración de eritromicina empleada es de 3 veces la CMI de *E. coli* KZM120. Tras incubación a 37°C durante aproximadamente 24 horas se observó el crecimiento de una única colonia. El ADN plasmídico (pERY) obtenido a partir de esta colonia fue reintroducido en *E. coli* KZM120 y se determinaron las CMIs a diversos antibióticos (Tabla 5). Únicamente se observan diferencias en la CMI a eritromicina. Ésta es de 2 µg/ml en *E. coli* KZM120 (pERY) y de 32 µg/ml *E. coli* KZM120 (pUC19). Por lo tanto, el determinante contenido en pERY únicamente confiere resistencia a eritromicina y no parece estar implicado en un fenotipo de multirresistencia. El análisis de Western (datos no mostrados) con el anticuerpo anti-Omp54 no reveló la presencia de bandas proteicas inmunoreactivas al suero en las muestras de *E. coli* KZM120 (pERY). Por lo tanto, la resistencia a eritromicina que confiere pERY no parece estar relacionada con la proteína Omp54 sobreexpresada en *S. maltophilia* D457R.

El análisis de pERY con el enzima de restricción *EcoRI* puso de manifiesto la presencia de un inserto de aproximadamente 6,8 kpb que contiene dos fragmentos *EcoRI*. Los dos fragmentos de restricción *EcoRI* (ERY1 y ERY2) se subclonaron en el vector pUC19 y se introdujeron en *E. coli* KZM120. Los transformantes que contenían la construcción pERY1 adquirieron la resistencia a eritromicina, mientras que los que contenían la construcción

pERY2 permanecieron susceptibles al agente de selección. La secuenciación y el posterior análisis de una región de 5.451 kpb contenida en pERY1 reveló la presencia de diversas ORFs. La comparación con secuencias de las bases de datos puso de manifiesto homologías con genes presentes en bacterias Gram-positivas. La organización génica de esta región se muestra en la Figura 7. A continuación se describen los genes homólogos *mphBM*, *bin3*, *cadC*, *cadA* y IS257.

4.3.1 *mphBM*

El análisis de la región comprendida entre los nucleótidos 1 y 912 del inserto contenido en pERY1 puso de manifiesto una homología del 98,2% a nivel de ADN con el gen *mphBM* de *S. aureus* (Matsuoka y cols., 1998). Este gen, con un contenido en G+C del 36,8%, codifica la síntesis de una fosfotransferasa de tipo II de macrólidos y ha sido descrita en el plásmido pMS97 de *S. aureus*. Los valores de identidad y similitud a nivel de proteínas son del 98,3% y del 99,7%, respectivamente. Se han descrito homólogos de *mphBM* en *E. coli* (Noguchi y cols., 1995; Noguchi y cols., 1996) y en *Streptomyces rochei* (Fernandez Moreno y cols., 1997). Sin embargo, los valores de homología de estos están en el rango de 30% al 50%. El hecho de que el gen de *S. maltophilia* y de *S. aureus* sean prácticamente idénticos sugiere que la adquisición de *mphBM* por parte de *S. maltophilia* es muy reciente. El aumento en la CMI de la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido pERY1 indica que, independientemente del posible origen Gram-positivo de *mphBM*, éste es funcional en bacterias Gram-negativas.

4.3.2 *bin3*

El análisis de la secuencia aguas abajo del gen *mphBM* reveló la presencia de una región homóloga a la zona central del transposon Tn552 de *S. aureus*. Esta región comprende los nucleótidos 1309 a 2053 del inserto contenido en pERY1 y tiene un contenido en G+C del 31,8%. El gen *bin3* (Rowland y Dyke, 1989), situado en la zona central del transposon Tn522, codifica la síntesis de una invertasa y se ha descrito en el plásmido pI9789 de *S. aureus*. La homología a nivel de ADN entre *bin3* de *S. aureus* y de la región encontrada en pERY1 es del 86,3%. A nivel de proteína los valores de identidad y similitud son del 92,5% y del 98%, respectivamente. Además, aguas arriba del gen *bin3* en *S. aureus* se encuentra una región de 107 pb que también está presente en el inserto contenido en pERY1. Este se encuentra en posición invertida con respecto al homólogo de *bin3* en pERY1. La función de este gen se desconoce en *S. aureus*.

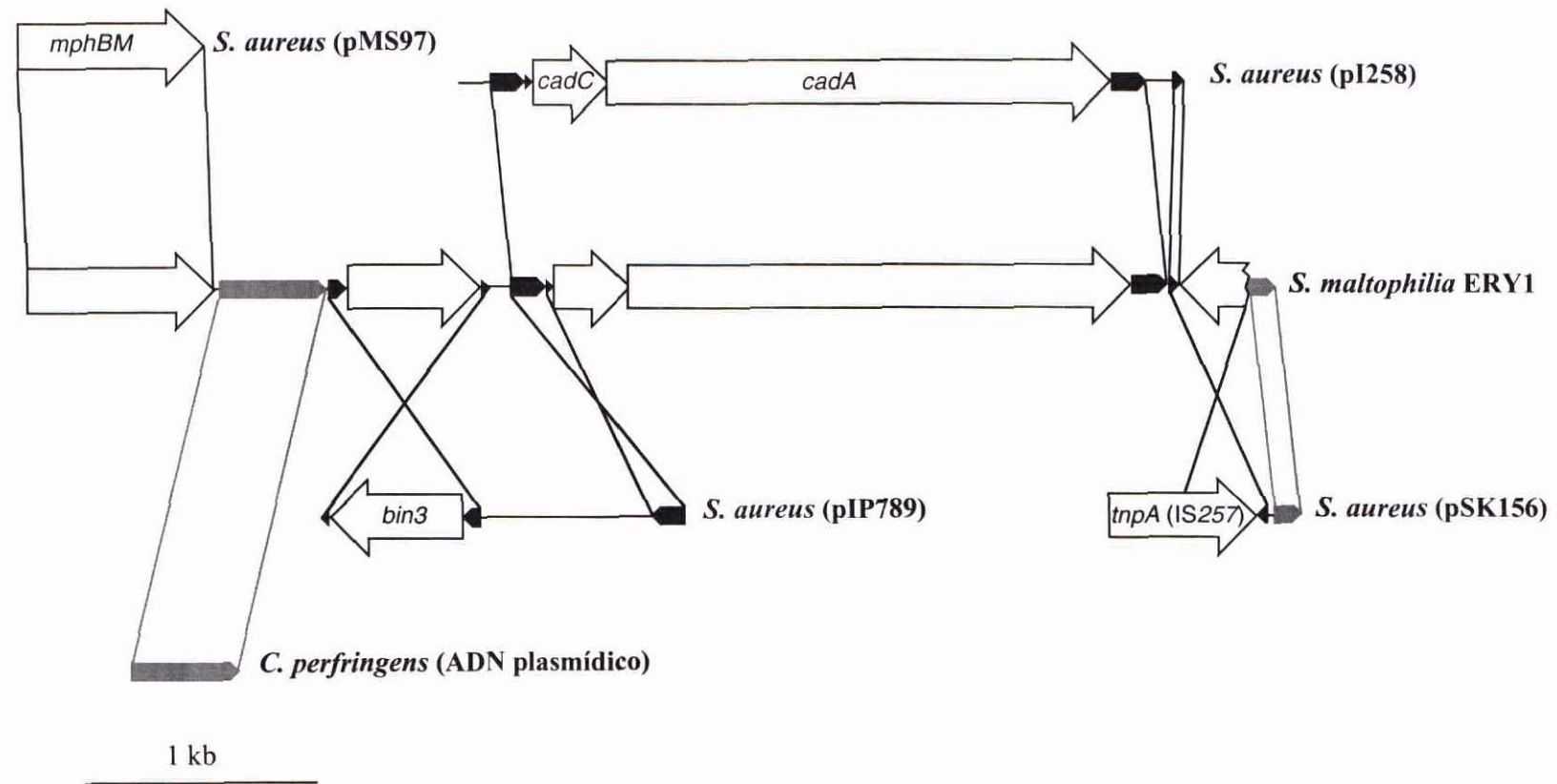


Figura 7. Organización génica de la región ERY1 clonada a partir de ADN cromosómico de *S. maltophilia* D457R. Las flechas blancas indican la localización y la orientación de las ORFs en ERY1 y de las secuencias homólogas con una identidad a nivel de ADN superior al 90%. Las flechas negras corresponden a regiones no codificantes con una identidad superior al 90% y las flechas grises corresponden a secuencias no codificantes con una identidad inferior al 90%.

4.3.3 *cadC* y *cadA*

La región comprendida entre los nucleótidos 2137 y 2247 de pERY1 mostró homología con genes implicados en la resistencia a cadmio (*cadC* y *cadA*) de *S. aureus*. El contenido en G+C de esta región en pERY1 es del 37,1%. Los genes *cadC* y *cadA* han sido descritos por primera vez en el plásmido pI258 de *S. aureus* (Nucifora y cols., 1989). El gen *cadC* (Yoon y cols., 1991) codifica la síntesis del regulador de la expresión de *cadA*, implicado en el transporte activo de cadmio. Los valores de identidad y similitud a nivel de proteína son del 96,7% y del 98,4% en el caso del *cadC*. Para *cadA* los valores de identidad y similitud también son altos, siendo éstos del 98,9% y del 99,5%. Aguas abajo de *cadA* la identidad entre pERY1 y *S. aureus* se mantiene, excepto por una región interna de 103 pb presente en *S. aureus* y que no aparece en pERY1. Además la región de 107 pb presente en pERY1 y aguas arriba del homólogo de *bin3* del Tn552 también se encuentra aguas arriba del gen *cadC*. A nivel de ADN la identidad entre esta región en pERY1 y en *S. aureus* (pI258) es del 99,1%. Tampoco se conoce su función en *S. aureus* (pI258).

4.3.4 IS257

El análisis de la región aguas abajo del gen homólogo a *cadA* reveló que no sólo presenta homología con el plásmido pI258 de *S. aureus*, sino también con una región de la secuencia de inserción IS257 descrita en el plásmido pSK156 de *S. aureus*. En pERY1 esta región está comprendida entre los nucleótidos 4903 y 5013 y tiene un contenido en G+C del 34,6%. Esto puede indicar que aguas abajo del gen *cadA* del plásmido pI258 se encuentra la secuencia de inserción IS257. En pERY1 la zona homóloga está codificada en el ADN complementario respecto a los demás genes descritos e incluye una de las secuencias invertidas y parte del gen *tnpA* que codifica la síntesis de una transposasa. A nivel de ADN esta zona presenta un 99% de identidad con respecto a la región descrita en el plásmido pSK156 de *S. aureus*. El gen homólogo a *tnpA* encontrado en pERY1 está truncado por una secuencia de 133 pb. Esta región presenta un 64,5% de identidad a nivel de ADN con la región situada aguas abajo del gen *tnpA* de *S. aureus* (pSK156) (Paulsen y cols., 1998). La función de esta región no se conoce.

4.3.5. La agrupación de genes presentes en pERY se encuentra en el cromosoma de *S. maltophilia* D457R

La presencia de esta agrupación génica en el genoma de *S. maltophilia* resulta notable, máxime si se tiene en cuenta su más que probable origen Gram-positivo, y el hecho de que el gen de resistencia a eritromicina no sería fácilmente seleccionable en *S. maltophilia* porque esta especie, como todas las bacterias Gram-negativas, es intrínsecamente resistente a dicho antibiótico, que por tanto no se utiliza en el tratamiento de las infecciones por bacterias Gram-negativas.

La adquisición de estos genes podría ser a través de un plásmido o de un inserto en el cromosoma. Distintos intentos de obtener plásmidos de *S. maltophilia* D457R dieron resultado negativo (datos no mostrados). Sin embargo, el análisis mediante PCR de dos preparaciones cromosómicas distintas de esta cepa obtenidas con un año de diferencia una de la otra (Figura 8), demostraron que el gen *mphBM* se encuentra en el cromosoma de *S. maltophilia* D457R. En la reacción de PCR se emplearon los oligonucleótidos *ery1* y *ery2* (Tabla 4) y la temperatura de anillamiento fue de 60°C.

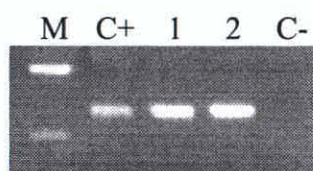


Figura 8. Amplificación de una región interna del gen *mphBM* a partir de dos muestras de ADN cromosómico de *S. maltophilia* D457R obtenidas con un año de diferencia (1 y 2). La región amplificada es de 140 pb. Muestras C+, pERY1 y C-, en ausencia de ADN. M, marcadores de peso molecular, de arriba abajo, 200 y 100 pb.

4.4 Clonaje de un sistema de eflujo a partir de *S. maltophilia* D457R

El clonaje por complementación del sistema de multirresistencia acoplado a Omp54 requería un hospedador que careciera de sistemas de eflujo activos. En un principio se intentó infectar *E. coli* KZM120 (Tabla 2) con la mezcla de bacteriófago λ que contiene la genoteca genómica de *S. maltophilia* D457R. Los intentos de infección con el bacteriófago λ resultaron negativos, *E. coli* KZM120 se mostró resistente a la infección. Debido a esto, se buscó otro hospedador y nos decantamos por *E. coli* HB101 (Tabla 2) ya que está descrito que es susceptible a la infección por fagos P1 y por el bacteriófago λ . Para obtener un derivado de *E. coli* HB101 sin el sistema de bombeo *acrAB*, se preparó un lisado de fagos P1 a partir de *E. coli* KZM120 y se utilizó para infectar *E. coli* HB101. La selección de derivados de *E. coli* HB101 que tuviesen el sistema *acrAB* inactivado se hizo suplementando el LB agar con kanamicina. En este caso, también obtuvimos resultados negativos: en tres intentos de infección no se obtuvo ninguna colonia en el medio de selección. A continuación se buscó otro receptor para las infecciones con los bacteriófagos P1 y λ . Nos decantamos por *E. coli* LE392 (Tabla 2) ya que está descrito que es susceptible a la infección por ambos

bacteriófagos. Se procedió a infectar *E. coli* LE392 con el lisado de fagos P1 y en esta ocasión sí se obtuvieron colonias en el medio de selección. El análisis de las CMI (Tabla 5) de uno de estos transductantes, *E. coli* AA81, reveló que presentaba un fenotipo de hipersensibilidad característico de la inactivación de los genes *acrAB*. A continuación se procedió a infectar *E. coli* AA81 con la genoteca genómica de *S. maltophilia* D457R construida en el cósmido pLAFR3 y empaquetada en una mezcla de bacteriófagos λ (ver apartado 3.2.9). Se realizó una selección directa en presencia de eritromicina permitiendo el crecimiento de clones que expresen genes que complementen la sensibilidad de *E. coli* AA81. La concentración de eritromicina empleada (9 $\mu\text{g/ml}$) es de 3 veces la CMI de *E. coli* AA81. Aunque el número de clones que se plaquearon en el medio con eritromicina fue alto (aproximadamente 10^4 colonias) solamente una colonia creció tras 48 horas de incubación a 37°C . Esta colonia contenía un cósmido recombinante que hemos denominado pAS1.

4.4.1 pAS1 confiere resistencia múltiple a antibióticos

Para confirmar que el crecimiento del clon *E. coli* AA81 en el medio selectivo se debía al elemento extracromosómico y no a una posible mutación en la cepa receptora, el cósmido pAS1 se movilizó a la cepa *E. coli* AA68 por conjugación tripartita. Como se muestra en la Tabla 5, la introducción de pAS1 en *E. coli* AA68 confiere resistencia a eritromicina (el agente de selección) y a otros antibióticos. El incremento en las CMI de *E. coli* AA68 (pAS1) comparado con *E. coli* AA68 (pLAFR3) es de 256 veces para la eritromicina, 16 veces para el cloranfenicol y de 6 veces para los distintos miembros de la familia de las quinolonas. No se observan diferencias significativas en las CMI a amikacina ni a los β -lactámicos. Ésto indica que el fragmento cromosómico de *S. maltophilia* D457R contenido en pAS1 está implicado en un fenotipo de multirresistencia cuando se expresa en *E. coli*.

4.4.2 pAS1 codifica una proteína de membrana externa inmunoreactiva a anti-Omp54

Para verificar si el determinante de multirresistencia contenido en pAS1 está relacionado con la proteína Omp54 sobreexpresada en *S. maltophilia* D457R, se procedió al análisis de proteínas por electroforesis. Las proteínas de extractos celulares totales y de membranas externas de *E. coli* AA81 (pLAFR3), AA81 (pAS1), AA68 (pLAFR3) y AA68 (pAS1) y de *S. maltophilia* D457 y D457R se separaron en geles PAGE-SDS al 8%. La tinción de los geles (Figura 9, Panel A) reveló la presencia de una proteína en las preparaciones de membranas externas de los transformantes *E. coli* AA81 (pAS1) y AA68 (pAS1) que no aparecía en las muestras procedentes de *E. coli* AA81 (pLAFR3) y AA68 (pLAFR3). El tamaño de esta proteína es semejante al de la proteína Omp54 sobreexpresada en *S. maltophilia* D457R. El análisis de transferencia de Western reveló que esta nueva proteína es inmunoreactiva al suero anti-Omp54 (Figura 9, Panel B). Estos resultados indican

que el fragmento de ADN de *S. maltophilia* contenido en pAS1 codifica la síntesis de una proteína de tamaño semejante e inmunologicamente relacionada con Omp54.

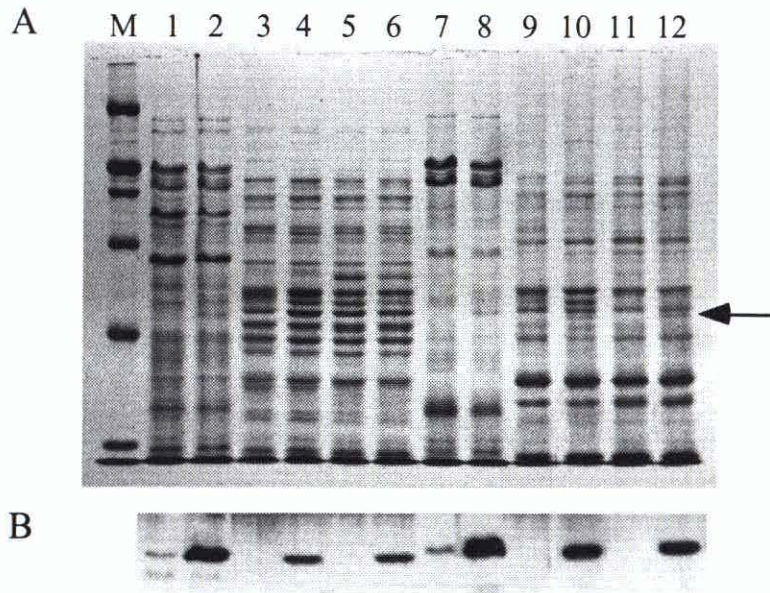


Figura 9. Inmunodetección de Omp54 en cepas de *E. coli* que contienen el cósmido pAS1. Panel A: análisis electroforético (PAGE-SDS 8%) de proteínas de extractos celulares (carriles 1 al 6) y de membranas externas (carriles 7 al 12). Panel B: transferencia de Western e inmunodetección con suero anti-Omp54. Cada carril contiene 5 µg de proteína. Carriles 1 y 7, *S. maltophilia* D457; carriles 2 y 8, *S. maltophilia* D457R; carriles 3 y 9, *E. coli* AA81, carriles 4 y 10 *E. coli* AA81 (pAS1); carriles 5 y 11, *E. coli* AA68; carriles 6 y 12, *E. coli* AA68 (pAS1). La flecha señala Omp54. M, marcadores de peso molecular, de arriba abajo: 200, 116, 97, 66, 45 y 31 kDa.

4.5 Subclonaje y secuenciación del determinante de multirresistencia clonado a partir de *S. maltophilia* D457R

4.5.1 Cósmido pAS1

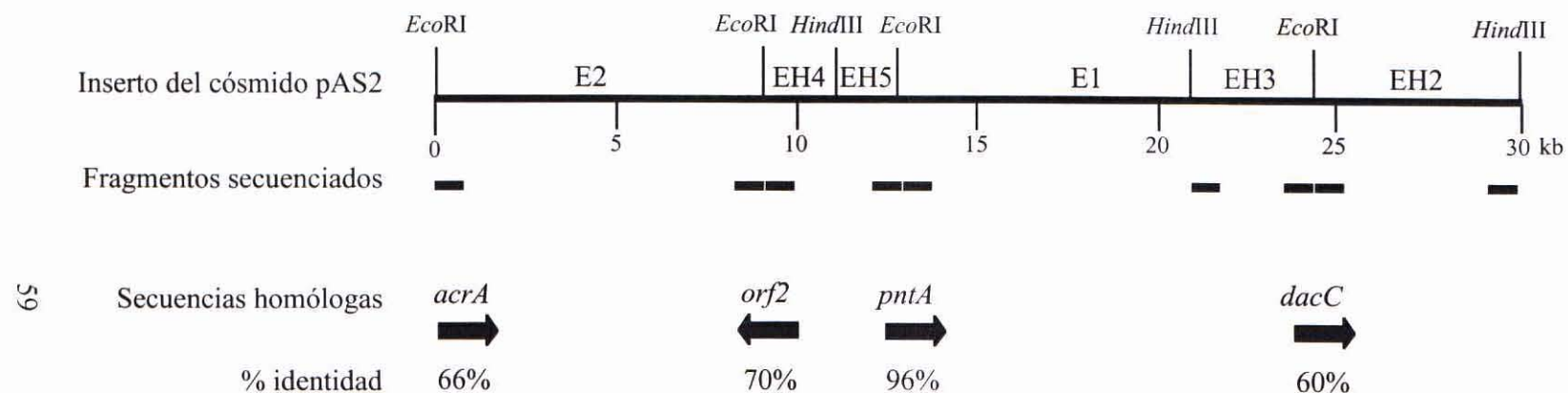
El cósmido pAS1 fue tratado con los enzimas de restricción *Eco*R1, *Hind*III y *Eco*RI más *Hind*III y los fragmentos de digestión analizados por electroforesis en geles de agarosa al 0,6% (Figura 10). El tamaño total del inserto contenido en pAS1 es de aproximadamente 30

kpb. Los fragmentos E1, E2, EH2, EH3, EH4 y EH5 se subclonaron en el vector pUC19 y se introdujeron en *E. coli* AA72 (Tabla 2). La cepa hipersusceptible *E. coli* AA72 (Tabla 5) se ha obtenido por transducción P1 del lisado de fagos preparado a partir de *E. coli* KZM120. La selección de transformantes se hizo en LB agar en presencia de kanamicina (25 µg/ml) y ampicilina (200 µg/ml). Las colonias que crecieron en kanamicina y ampicilina se aislaron y se comprobó la presencia de los plásmidos recombinantes.



Figura 10. Análisis electroforético de los fragmentos de restricción de pAS1 en gel de agarosa al 0,6%. Carril 1, pLAFR3; carril 2, pAS1; carril 3, digestión pAS1 + *EcoRI*; carril 4, digestión pAS1 + *HindIII*; carril 5, digestión pAS1 + *EcoRI* + *HindIII*. M, marcador de peso molecular, de arriba abajo: 23,13/ 9,42/ 6,56/ 4,36/ 2,32 y 2,03 kpb.

Se realizó la secuenciación parcial de los 6 plásmidos recombinantes empleando los oligonucleótidos universales M13 directo y reverso. Las secuencias nucleotídicas se compararon con secuencias de la base de datos EMBL empleando el programa FASTA del paquete informático GCG. La Figura 11 muestra la organización génica del fragmento de 30 kpb y las homologías que se encontraron. Uno de los extremos del fragmento E2 mostró homología con varios miembros de la familia MFP (membrane fusion protein) de diversos sistemas de eflujo de antibióticos (Dinh y cols., 1994).



acrA (ECACRAB): componente MFP del sistema de eflujo *acrAB* de *E. coli* (Ma y cols., 1993).
orf2 (POL010393): gen de función desconocida del operón *pha* (proteínas asociadas a los granulos de poli hidroxialcanoato) de *Pseudomonas oleovorans* (Prieto y cols, 1999).
pntA (ECD722): subunidad alfa de la enzima transhidrogenasa nucleótido piridina de *E. coli* (Oshima y cols., 1996).
dacC (X66086): proteína de unión a la penicilina de *E. coli* (Ahmad y cols., 1992).

Figura 11. Organización génica y mapa de resticción del inserto de 30 kb contenido en el cósmido pAS2. Las secuencias de ADN indicadas con rectángulos se utilizaron para buscar secuencias homólogas en la base de datos EMBL. Los números de acceso de las secuencias homólogas se indican en parenthesis.

4.5.2 pUCE2

Debido a la homología que el fragmento E2 presentaba con componentes de sistema de eflujo, se realizó un análisis más detallado de la construcción pUCE2. Para ello, el plásmido pUCE2 se trató con el enzima de restricción *Pst*I y los fragmentos de digestión se analizaron por electroforesis en geles de agarosa. El tamaño total del inserto contenido en pUCE2 es de aproximadamente 9 kpb. Los fragmentos de digestión se subclonaron en el vector pUC19 y se introdujeron en *E. coli* AA72. La selección de transformantes se hizo en LB agar en presencia de kanamicina y ampicilina. Las colonias que crecieron en kanamicina y ampicilina se aislaron y se comprobó la presencia de los plásmidos recombinantes.

Se realizó la secuenciación parcial de los plásmidos recombinantes pUCP1, pUCP2, pUCP3, pUCP4, pUCP5 y pUCP8 y pUCP10 empleando los oligonucleótidos universales M13 directo y reverso. Las secuencias nucleotídicas se compararon con secuencias de la base de datos EMBL empleando el programa FASTA del paquete informático GCG, el resultado de la búsqueda se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Comparación de las secuencias nucleotídicas de los fragmentos de restricción *Pst*I de pUCE2 con secuencias de la base de datos EMBL.

Fragmento ^a	Gen	Organismo	Identidad (%)	Número de acceso	Referencia
P1	<i>acrA</i>	<i>E.coli</i>	66	ECACRAB	Ma y cols., 1993
P2	<i>mexB</i>	<i>P. aeruginosa</i>	58	PAENVCD	Poole y cols., 1993
P3-directo	1				
P3-reverso	<i>orf1</i>	<i>Rhodococcus corallinus</i>	66	RCTRZA	Saho y cols., 1995
P4	<i>mexB</i>	<i>P. aeruginosa</i>	70	PAENVCD	Poole y cols., 1993
P5	<i>orf2</i>	<i>P. oleovorans</i>	68	POLO10393	Prieto y cols., 1999
P8	<i>oprM</i>	<i>P. aeruginosa</i>	58	PAENVCD	Poole y cols., 1993
P10	1				

^a, directo corresponde a la secuencia determinada a partir del oligonucleótido M13 directo y reverso corresponde a la secuencia determinada a partir del oligonucleótido M13 reverso. En los demás fragmentos, la búsqueda con las secuencias P1 y P2 directas y reversas dan homología con los mismos genes y los fragmentos P4, P5, P8 y P10 sólo se realizó la secuenciación a partir del oligonucleótido M13 directo ya que presentan un tamaño inferior a 1 kpb.

1, no se encontraron secuencias en la base de datos EMBL con homología significativa.

Se observa la presencia en el fragmento E2 de genes homólogos a *acrA* de *E. coli* y a *mexB* y *oprM* de *P. aeruginosa*, componentes de sistemas de bombeo de antibióticos en ambas especies. No se conoce la función del gen *orf1* de *Rhodococcus corallinus*, aunque forma parte del operón *atr* implicado en el catabolismo del herbicida atrazeno de esta especie. El análisis parcial de la secuencia del fragmento E2 nos sugiere que esta zona contiene genes que pueden estar implicados en el fenotipo de multirresistencia de *S. maltophilia* D457R. Por lo tanto, a partir del plásmido pUCE2 se secuenció con cebadores internos una región de 6 kpb. El análisis de esta región con el programa CodonPreference del paquete informático GCG y empleando la tabla de uso de codones de *E. coli*, identificó 3 fases abiertas de lectura codificadas en la misma hebra de ADN (Figura 12). La Tabla 7 muestra algunas de las características de los 3 genes y de sus productos ORF1 (*smeD*), ORF2 (*smeE*) y ORF3 (*smeF*).

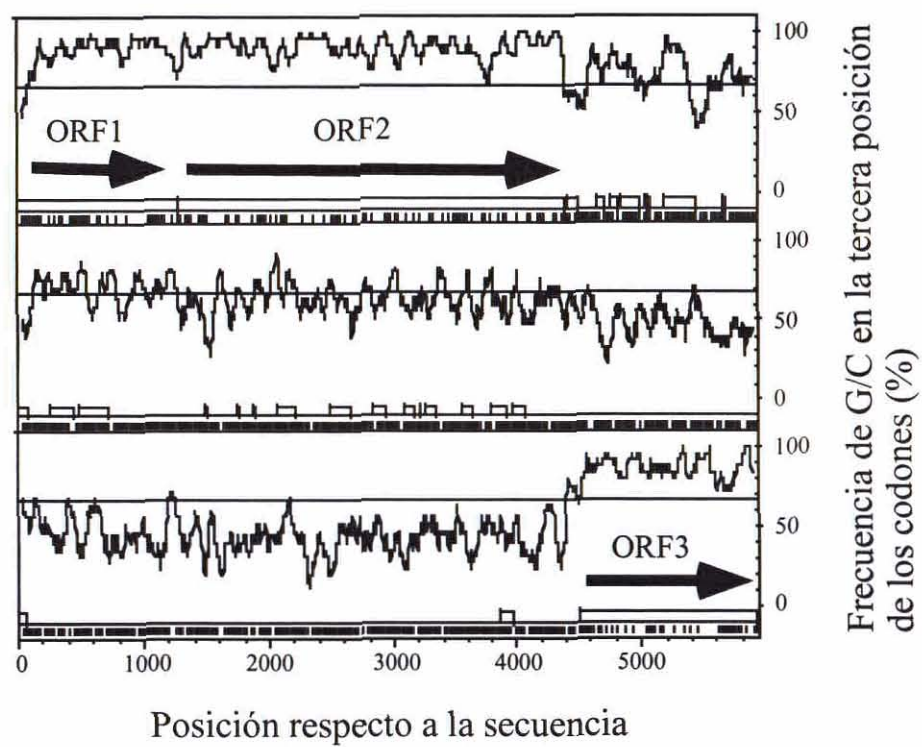


Figura 12. Análisis de las fases de lectura abierta (ORFs) de la secuencia de ADN de *S. maltophilia* D457R clonada en pUCE2. Se ha utilizado la tabla de uso de codones de *E. coli*.

Tabla 7. Características generales de las ORFs secuenciadas a partir de la construcción pUCE2.

ORF	codon inicio/ codon terminación	nucleótidos	aminoácidos	peso molecular (kDa)
<i>smeD</i>	ATG/TAA	82-1266 (1184)	394	40,9
<i>smeE</i>	ATG/TGA	1279-4401 (3122)	1040	111,3
<i>smeF</i>	ATG/TAA	4494-5894 (1400)	466	50,0

4.6 Análisis comparativo de la secuencia de amino ácidos de las proteínas SmeD, SmeE y SmeF

El análisis comparativo de cada una de las tres ORFs con proteínas de las bases de datos reveló homología con diversos componentes de bombas de extrusión de bacterias Gram-negativas. Para mantener un consenso con la nomenclatura en uso, denominamos a este sistema *smeDEF*, *Stenotrophomonas maltophilia* *efflux*, debido a la homología que presenta con el sistema de eflujo *smeRSABC* de *S. maltophilia* descrito recientemente (<http://www.ebi.ac.uk/htbin/expasyfetch?AF173226>). El sistema *smeRSABC* no está implicado en el eflujo de antibióticos y por lo tanto no confiere un fenotipo de multirresistencia.

4.6.1 ORF 1 (SmeD)

Se encontró homología con lipoproteínas de la familia MFP (membrane fusion proteins) que a su vez forman parte de bombas de extrusión (Dinh y cols., 1994). Se cree que las proteínas de esta familia permiten el transporte de sustratos a través de la doble membrana de bacterias Gram-negativas, fusionando las membranas externa e interna. En la Tabla 8 se muestran los valores de similitud y identidad de SmeD con diversas lipoproteínas de esta familia.

Tabla 8. Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeD con proteínas de la familia MFP (Membrane fusion proteins).

Proteína	Organismo	Identidad/Similitud (%)	Número acceso ^a	Referencia
AcrA	<i>E.coli</i>	48/63	sp-P31223	Ma y cols., 1993
AcrE	<i>E.coli</i>	48/64	sp-P24180	Klein y cols., 1991
YhiU	<i>E. coli</i>	42/59	sp-P37636	Sofia y cols., 1994
SmeA	<i>S. maltophilia</i>	41/59	tr-AAD51344	Zhang y cols., 1999
MexA	<i>P. aeruginosa</i>	47/60	sp-P52477	Poole y cols., 1993
MexC	<i>P. aeruginosa</i>	40/56	tr-Q51395	Poole y cols., 1996
MexE	<i>P. aeruginosa</i>	28/44	tr- P95421	Kohler y cols., 1997
MexX	<i>P. aeruginosa</i>	30/44	tr-Q9ZNG9	Mine y cols., 1999
TtgA	<i>P. putida</i>	46/61	tr-Q9WWZ9	Ramos y cols., 1998
SrpA	<i>P. putida</i>	44/61	tr-O31099	Kieboom y cols., 1998
MtrC	<i>N. gonorrhoeae</i>	38/53	sp-P43505	Hagman y cols., 1995
IfeA	<i>A. tumefaciens</i>	35/53	tr-O68440	Palumbo y cols., 1998

^a sp, SwissProt; tr, TrEMBL.

En la zona N-terminal de SmeD se encontró una secuencia característica de péptido señal precursor de lipoproteínas (Hayashi y Wu, 1990). El motivo conservado y el motivo encontrado en SmeD se muestra a continuación:

Tabla 9. Motivo péptido señal precursor de lipoproteínas identificado en SmeD.

Motivo conservado	[^DERK]{6}[LIVMFWSTAG]{6}[LIVMFYSTAGCQ][AGS]C
Motivo SmeD	MLLSRIRPFALSLAIAATVAACGGQPQAPEQGPGDV...
	(1)

Además del motivo conservado, se tienen que cumplir una serie de características: el residuo de cisteína debe de estar situado entre las posiciones 15 y 35 de la secuencia en

cuestión y debe de haber al menos un residuo cargado (lisina (L) o arginina (A)) en los siete primeros residuos de la secuencia. En el caso de SmeD, la cisteína se encuentra en la posición 22 y existen 2 residuos cargados entre los primeros siete amino ácidos de la proteína.

4.6.2 ORF 2 (SmeE)

La comparación de SmeE con proteínas de las bases de datos mostró homología con miembros de la familia RND (resistance nodulation cell division) (Paulsen y cols., 1996). En la Tabla 10 se muestran los valores de similitud y identidad de SmeE con diversas proteínas de esta familia. Esta familia está compuesta por proteínas implicadas en el transporte secundario de diversos compuestos a través de la membrana citoplasmática.

Tabla 10. Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeE con proteínas de la familia RND (Resistance nodulation cell division).

Proteína	Organismo	Identidad/Similitud (%)	Número acceso ^a	Referencia
AcrB	<i>E.coli</i>	61/75	sp-P31224	Ma y cols., 1993
AcrF	<i>E.coli</i>	58/72	sp-P24181	Klein y cols., 1991
YhiV	<i>E. coli</i>	55/70	sp-P37637	Sofia y cols., 1994
SmeB	<i>S. maltophilia</i>	51/68	tr-AAD51345	Zhang y cols., 1999
MexB	<i>P. aeruginosa</i>	58/73	sp-P52002	Poole y cols., 1993
MexD	<i>P. aeruginosa</i>	45/62	tr-Q51396	Poole y cols., 1996
MexF	<i>P. aeruginosa</i>	39/55	tr-P95422	Kohler y cols., 1997
MexY	<i>P. aeruginosa</i>	45/62	tr-Q9ZNG8	Mine y cols., 1999
TtgB	<i>P. putida</i>	57/72	tr-O52248	Ramos y cols., 1998
SrpB	<i>P. putida</i>	52/68	tr-O31100	Kieboom y cols., 1998
MtrD	<i>N. gonorrhoeae</i>	45/62	tr-Q51073	Hagman y cols., 1995
IfeB	<i>A. tumefaciens</i>	50/64	tr-O68441	Palumbo y cols., 1998

^a sp, SwissProt; tr, TrEMBL.

La estructura característica de proteínas de esta familia consiste en la presencia de 12 segmentos que atraviesan la membrana (TMS) y 2 grandes regiones hidrofílicas entre los segmentos TMS 1 y 2 y los segmentos TMS 7 y 8. El análisis del índice de hidropatía (Kyte y Doolittle, 1982) de SmeE se muestra en la Figura 13. Un valor alto de índice de hidropatía indica que se necesita energía libre para la transferencia hacia el agua, es decir que el segmento es hidrofóbico. Se aprecian las 12 regiones hidrófobas y las 2 regiones hidrofílicas características de proteínas de la familia RND.

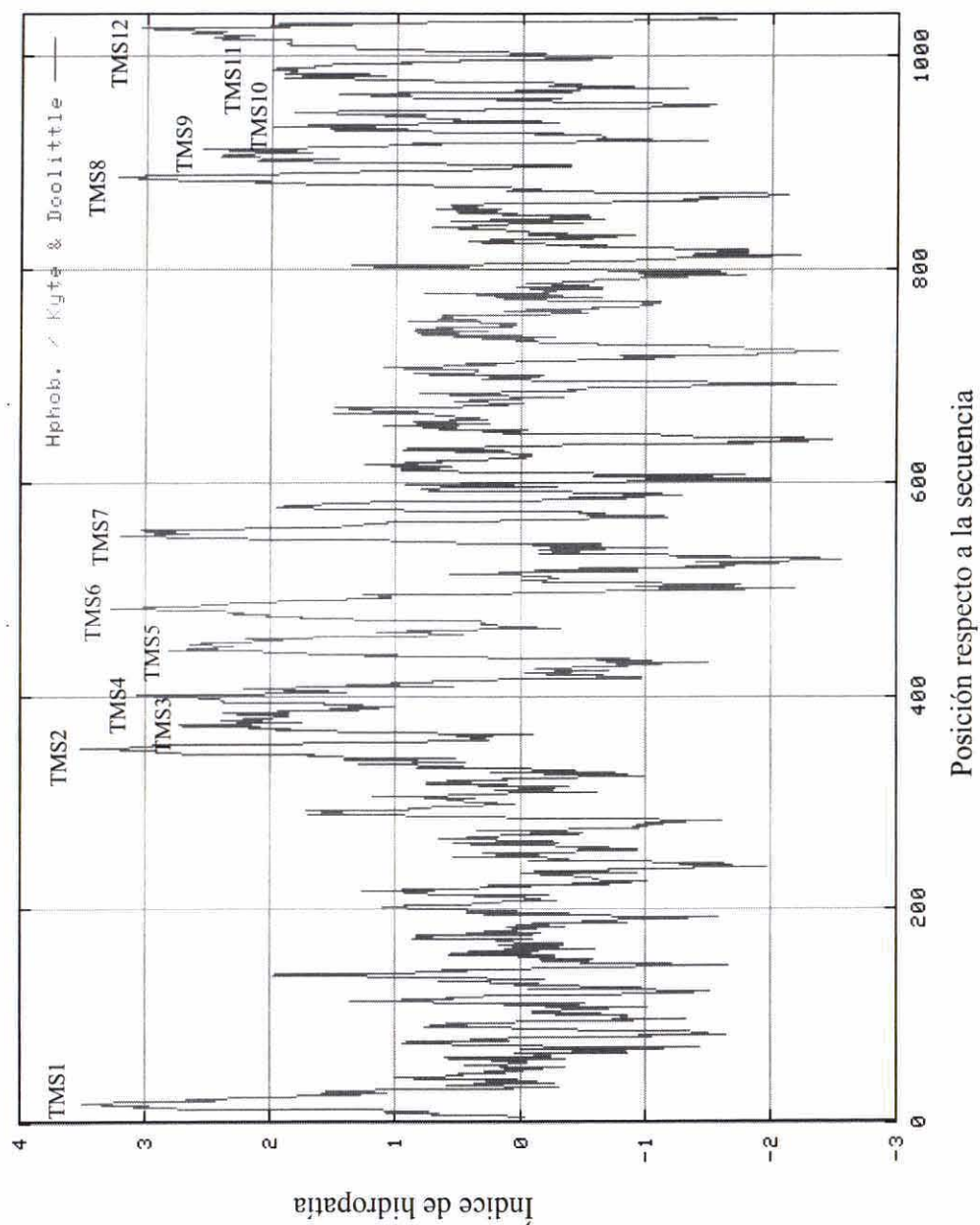


Figura 13. Análisis del índice de hidropatía de SmeE. Los valores positivos en el eje de abscisas indican que el segmento es hidrofóbico. Las regiones marcadas como TMS1 a TMS12 indican la situación de los dominios transmembranales.

4.6.3 ORF 3 (SmeF)

El análisis comparativo de SmeF con proteínas de las bases de datos reveló homología con proteínas de la familia OMF (outer membrane factor) (Paulsen y cols., 1997). En la Tabla 11 se muestran los valores de similitud y identidad de SmeF con diversas proteínas de esta familia.

Tabla 11. Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeF con proteínas de la familia OMF (Outer membrane factor).

Proteína	Organismo	Identidad/Similitud (%)	Número acceso ^a	Referencia
TolC	<i>E.coli</i>	21/37	sp-P02930	Niki y cols., 1990
SmeC	<i>S. maltophilia</i>	42/54	tr-AAD51346	Zhang y cols., 1999
OprM	<i>P. aeruginosa</i>	40/56	tr-Q9ZNM1	Poole y cols., 1993
OprJ	<i>P. aeruginosa</i>	36/53	tr-Q51397	Poole y cols., 1996
OprN	<i>P. aeruginosa</i>	27/42	tr-P95423	Kohler y cols., 1997
TtgC	<i>P. putida</i>	40/54	tr-Q9WWZ8	Ramos y cols., 1998
SrpC	<i>P. putida</i>	37/52	tr-O31101	Kieboom y cols., 1998
MtrE	<i>N. gonorrhoeae</i>	34/47	tr-Q51006	Hagman y cols., 1995

^a sp, SwissProt; tr, TrEMBL.

Al igual que en SmeD, también se encontró en SmeF una secuencia característica de péptido señal precursor de lipoproteínas (Hayashi y Wu, 1990). El motivo conservado y el motivo encontrado en SmeF se muestra a continuación:

Tabla 12. Motivo péptido señal precursor de lipoproteínas identificado en SmeF.

Motivo conservado	[^DERK]{6}[LIVMFWSTAG]{6}[LIVMFYSTAGCQ][AGS]C
Motivo SmeF	MEVIPMKSASLFLSIAATLALAGCSTLAPKNTAVAPA...
	(1)

En este caso, solamente se cumple una de las reglas mencionadas anteriormente: el residuo de cisteína se encuentra entre las posiciones 15 y 35, exactamente en la posición 24. No está presente ningún residuo cargado en los siete primeros amino ácidos de la secuencia.

4.7 SmeF y Omp54 son la misma proteína

Para determinar si la proteína Omp54 sobreexpresada en *S. maltophilia* D457R y el producto proteico codificado por *smeF* son efectivamente la misma proteína se analizaron por espectrometría de masas los fragmentos obtenidos tras digestión con tripsina de Omp54. Las masas de los fragmentos de digestión de Omp54 se compararon con las masas de los fragmentos trípticos teóricos deducidos a partir de la secuencia de SmeF. En la Figura 14 se muestra el resultado de dicha comparación en la que se observa que Omp54 y SmeF comparten el mismo patrón de digestión tríptico. El análisis por espectrometría de masas no detectó algunos de los fragmentos deducidos para SmeF, dos de ellos se encuentran en la región N-terminal de SmeF entre los aminoácidos 1 a 7 y 8 a 30. Estas regiones comprenden el motivo péptido señal precursor de lipoproteínas detectado en SmeF y su ausencia confirma que esta proteína es procesada. Por otro lado, el fragmento teórico de mayor tamaño (aminoácidos 243 a 305, 6.365 Da) de SmeF no se detectó en el espectro de masas. Esto puede deberse a la dificultad en la recuperación de fragmentos grandes a partir de geles.

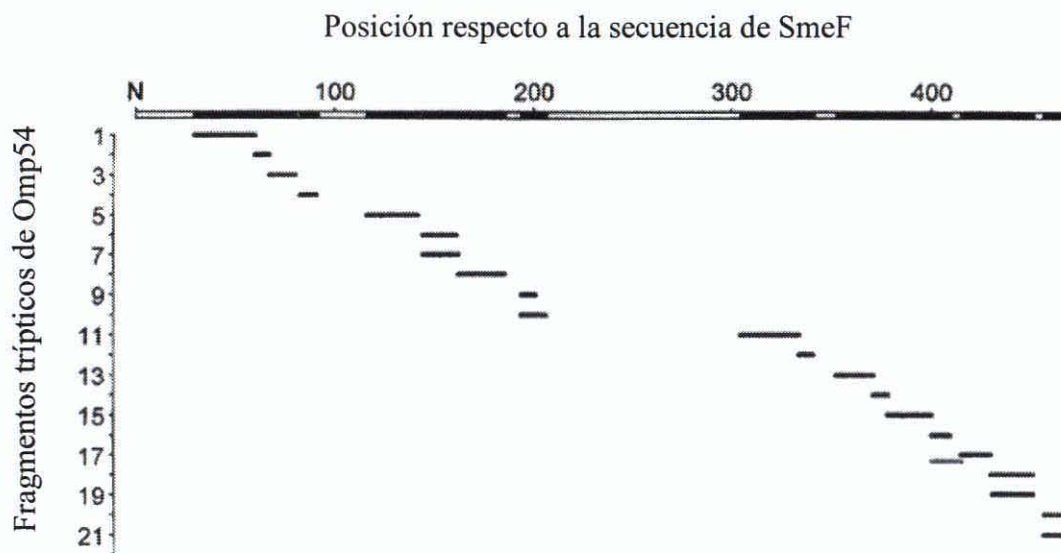


Figura 14. Comparación de los fragmentos trípticos de Omp54 y los deducidos a partir de la secuencia de SmeF. En el eje correspondiente a la secuencia de SmeF el fondo oscuro corresponde a la identificación de fragmentos de Omp54 de masa idéntica. No se han encontrado los fragmentos correspondientes a las zonas en blanco.

4.8 Estudio funcional del operón *smeDEF* expresado en *E. coli*

El análisis de la secuencia nos indica que el sistema *smeDEF* presenta homología con otros sistemas de eflujo de antibióticos de bacterias Gram-negativas. Estos sistemas están implicados en el transporte de diversos compuestos hacia el exterior celular, lo que conlleva una disminución notable en la concentración intracelular del compuesto. Para determinar la función del operón *SmeDEF*, éste se expresó en *E. coli* AA72 (Tabla 2). En esta cepa, los genes *acrAB* implicados en transporte activo de diversos compuestos han sido sustituidos por un gen de resistencia a kanamicina. Por lo tanto, es un receptor adecuado para estudiar la implicación de *smeDEF* en el bombeo activo de compuestos. El fragmento de restricción E2 se subclonó en el vector de bajo número de copias pCK01 aguas abajo del promotor *lac*. La construcción obtenida, pAS2, se introdujo en *E. coli* AA72. Por análisis de Western se comprobó que *SmeF* se expresa sin necesidad de inducción del promotor *lac* por IPTG (Figura 15).

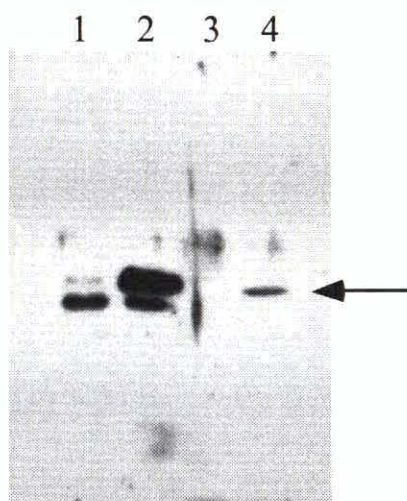


Figura 15. Inmunodetección de *SmeF* en extractos celulares de *S. maltophilia* D457 (1) y D457R (2) y en *E. coli* AA72(pCK01) (3) y AA72(pAS2) (4). En cada carril se han cargado 10 µg de proteína. La banda inmunoreactiva que corresponde a *SmeF* se señala con una flecha. La banda inferior que se observa en los extractos celulares de *S. maltophilia* D457 y D457R, solamente se detecta en condiciones de exposición largas. Desconocemos la naturaleza de la misma.

4.8.1 Fenotipo de multirresistencia

Las CMIs para diversos compuestos se muestran en la Tabla 5. Se observa un aumento notable en las CMIs de tetraciclina, eritromicina y quinolonas en *E. coli* AA72 (pAS2) comparado con el control en *E. coli* AA72 (pCK01). Mientras que no se observan diferencias significativas en los valores de CMIs de aminoglicósidos ni β -lactámicos.

4.8.2 Acumulación intracelular de norfloxacin y bromuro de etidio

Con el fin de determinar si la resistencia adquirida por la expresión de SmeDEF se puede explicar por una disminución en la acumulación de antibióticos ligada a la expresión de un sistema de bombeo, se procedió a realizar ensayos de acumulación. Se realizaron ensayos de acumulación para el bromuro de etidio y para la quinolona norfloxacin en ausencia y en presencia del desacoplante del gradiente de protones de la membrana CCCP. En la Figura 16 se muestran los resultados de tales ensayos. La acumulación intracelular de bromuro de etidio se siguió de forma continua. Se observa que los niveles de acumulación en *E. coli* AA72 (pAS2) que expresa SmeDEF son siempre más bajos que el control (Figura 16, Panel A). Para las dos cepas se llega a la saturación y ésta es 3 veces menor en *E. coli* AA72 (pAS2) que en AA72 (pCK01). La adición de CCCP provoca un aumento gradual en los niveles intracelulares para las dos cepas, alcanzando tras 5 min la saturación. En este caso, la inhibición del gradiente de protones hace que en las dos cepas se alcance el mismo nivel de acumulación. En el caso de la norfloxacin (Figura 16, Panel B) también existe una diferencia significativa en los niveles de acumulación. A los 5 min en *E. coli* AA72 (pAS2) la concentración intracelular es 2 veces menor que en *E. coli* AA72 (pCK01). El efecto del CCCP también es bastante claro, después de 5 min de añadir el inhibidor los niveles intracelulares de norfloxacin aumentan para las dos cepas alcanzando concentraciones muy parecidas. Estos resultados indican que SmeDEF es una bomba de eflujo de antibióticos acoplada al gradiente de protones de la membrana y funcional cuando se expresa en *E. coli*.

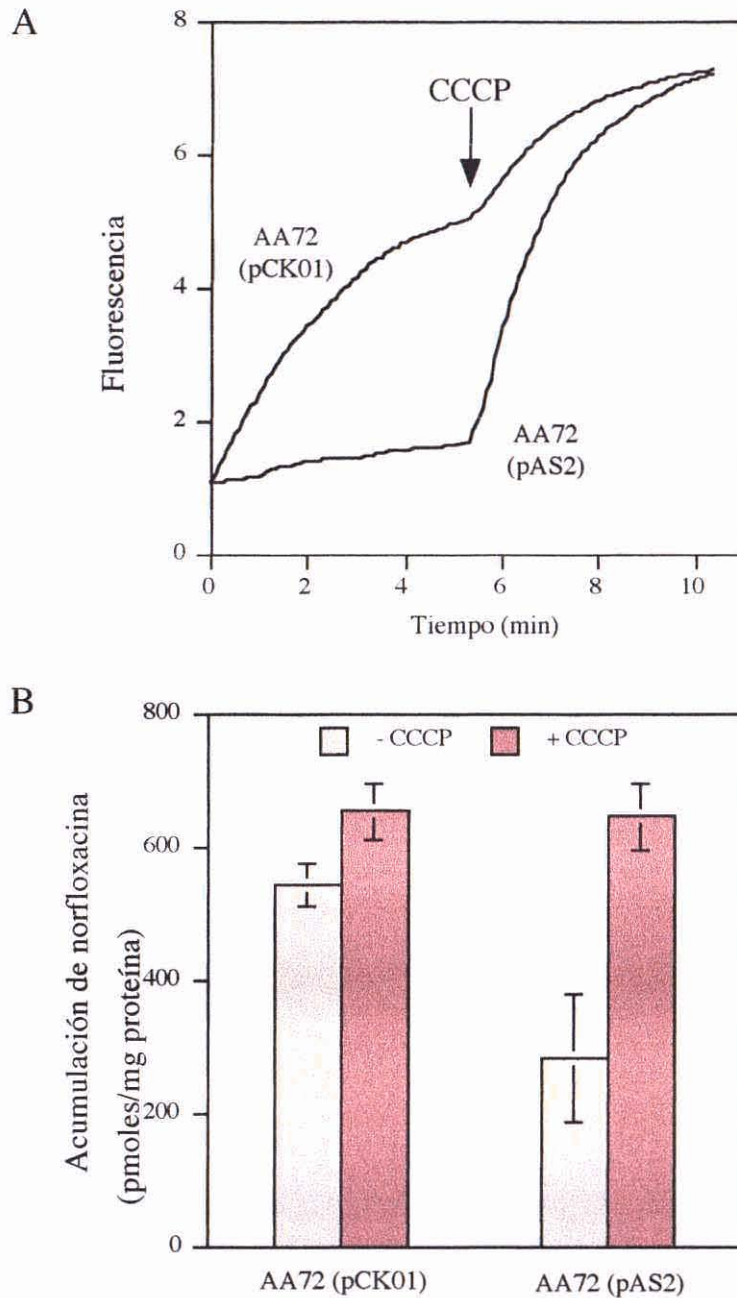


Figura 16. Acumulación intracelular de bromuro de etidio (panel A) y de norfloxacina (panel B) por las cepas *E. coli* AA72 (pCK01) y AA72 (pAS2). La concentración final de CCCP es de 100 μ M.

4.9 Expresión del operón *smeDEF* a lo largo del crecimiento de *S. maltophilia*

Para conocer si la expresión de *smeDEF* en el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R está alterada con respecto a la cepa parental silvestre *S. maltophilia* D457, se procedió a realizar experimentos de transferencia de Western y de Northern. Se analizaron muestras procedentes de distintos puntos de la curva de crecimiento de cultivos crecidos en medio LB a 37°C. En el Panel A de la Figura 17 se muestran las curvas de crecimiento y los puntos analizados.

4.9.1 SmeF

La expresión de SmeF fue seguida por transferencia de Western de muestras de 5 µg de proteína total e inmunodetección con el anticuerpo anti-SmeF. La Figura 17 (Panel B) muestra el resultado de este análisis. Es muy patente la diferencia de los niveles de SmeF entre las dos cepas. En *S. maltophilia* D457 éstos son muy bajos mientras que en *S. maltophilia* D457R se observa una notable sobreexpresión de la misma. Se observa que la expresión de SmeF a lo largo de la curva de crecimiento se mantiene constante para las dos cepas. Estos datos indican que SmeF se expresa de forma constante o que es una proteína muy estable.

4.9.2 *smeDEF*

El análisis de transcripción de *smeDEF* fue seguido por análisis de Northern mediante hibridación con una sonda que reconoce el gen *smeD*. La Figura 18 (Panel A) muestra el resultado con la sonda *smeD* en la que se observa claramente la diferencia en los niveles de transcritos entre las dos cepas. En las muestras procedentes de *S. maltophilia* D457 los niveles de los transcritos son casi indetectables, mientras que en *S. maltophilia* D457R se detectan transcritos de distintos tamaños. El transcrito de mayor tamaño deducido por comparación con el patrón de pesos moleculares es de 5,8 kb, siendo éste consistente con el tamaño putativo del operón *smeDEF*. También se detectan transcritos mayoritarios de menor tamaño. Esto indica que el ARNm *smeDEF* está siendo procesado o que se está dando una degradación del ARNm. Por otro lado, los niveles de transcritos de las distintas muestras de *S. maltophilia* D457R revelan una dependencia de la fase de crecimiento. En la fase exponencial temprana se da la transcripción máxima, ésta disminuye de forma gradual hasta llegar a niveles no detectables a las 24 horas. Este patrón solamente se intuye en la muestras de *S. maltophilia* D457 ya que el fondo de ARN ribosómico impide la observación de los transcritos. Debido a esto, se procedió a realizar otro análisis de Northern en la que los tiempos de lavados y de exposición se aumentaron con el fin de poder analizar los transcritos de las muestras de *S. maltophilia* D457. La Figura 18 (Panel B) muestra el resultado de este análisis en la que sí se observa la dependencia en la fase de crecimiento de los transcritos de *S. maltophilia* D457.

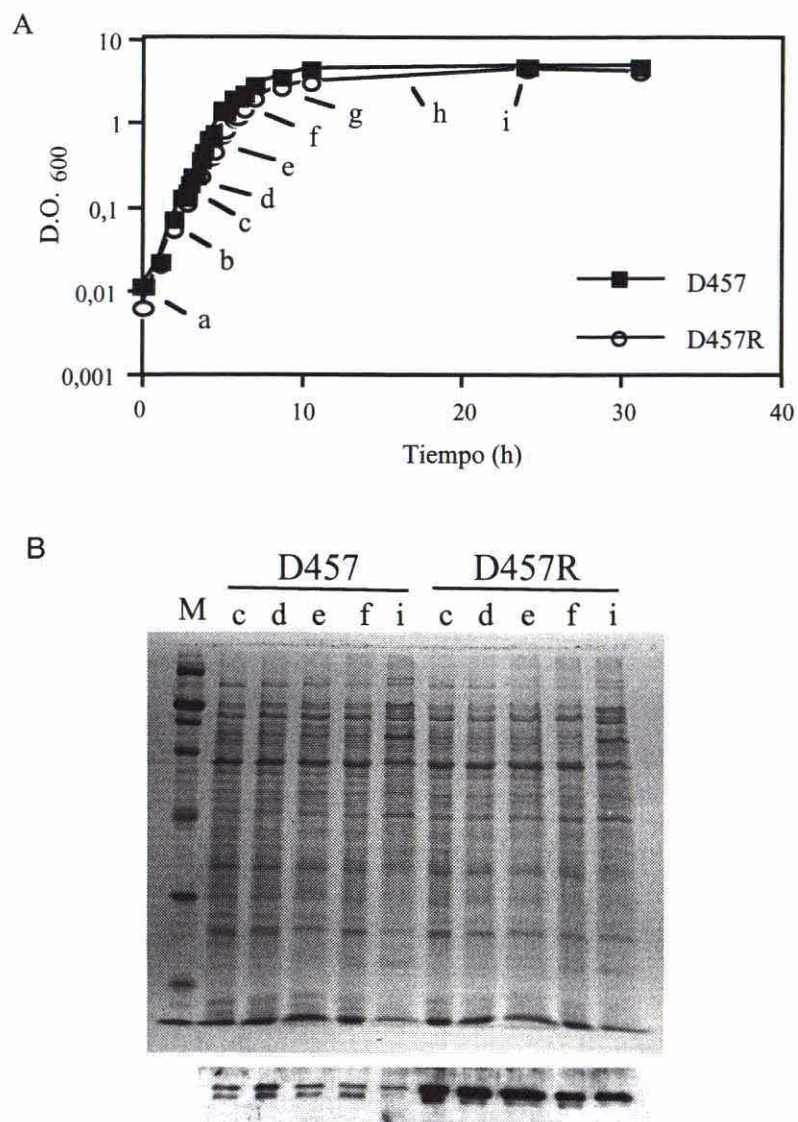


Figura 17. Análisis de la expresión de SmeF a lo largo de las curvas de crecimiento de *S. maltophilia* D457 y D457R. En el Panel A se muestran las curvas de crecimiento y los puntos analizados. El análisis PAGE-SDS 8% y la transferencia Western de 5 μ g de proteína de extracto total e inmunodetección con el anticuerpo anti-Omp54 se muestra en el Panel B. M, marcadores de peso molecular de arriba abajo: 200, 116, 97, 66, 45 y 31 kDa.

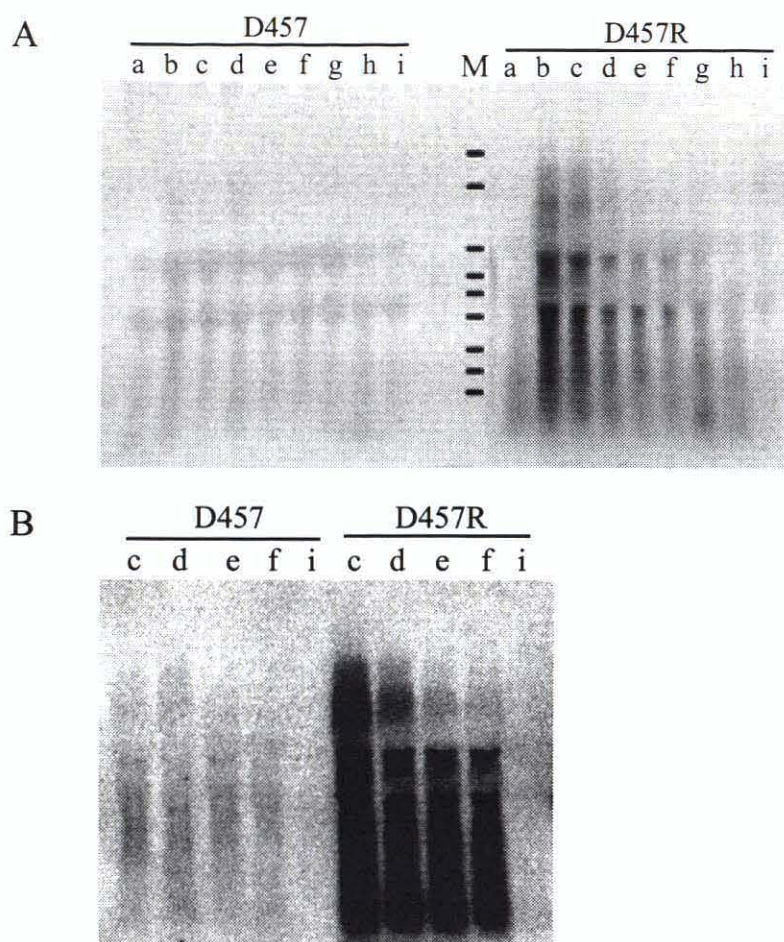


Figura 18. Análisis transcripcional de la expresión del operón *smeDEF* en *S. maltophilia* D457 y D457R a lo largo de la curva de crecimiento. Cada carril contiene 25 µg de ARN de muestras tomadas de distintos puntos de las curvas de crecimiento (ver Panel A de la Figura 18). Se empleó una sonda radioactiva que hibrida con una región interna del gen *smeD*. En el Panel A la dependencia en la fase de crecimiento de los transcritos correspondientes a las muestras de *S. maltophilia* D457 no se detecta de forma clara. Debido a esto se realizó otro análisis Northern (Panel B) en el que se aumentaron los tiempos de lavado y de exposición. M, marcadores de peso molecular, de arriba abajo: 6,9/4,7/2,7/1,8/1,5/1,0/ 0,6/0,4/0,3 kb.

En conjunto, estos resultados indican que la expresión de *smeDEF* esta regulada por al menos 2 sistemas. Uno de ellos depende de fase de crecimiento y tiene lugar tanto en *S. maltophilia* D457 como en *S. maltophilia* D457R. El otro es la represión observada en *S. maltophilia* D457, que desaparece en el mutante espontáneo D457R.

4.10 Clonaje de un regulador potencial del sistema *smeDEF*

La estructura génica de los sistemas de eflujo caracterizados en bacterias Gram-negativas está bastante conservada (Paulsen y cols., 1996), de modo que el gen regulador se encuentra aguas arriba del operón estructural (MFP, RND y OMF). Con el fin de intentar localizar dicho regulador en nuestro sistema, se procedió a la búsqueda de genes adyacentes al operón *smeDEF*. Para ello se utilizó una sonda *smeD* radioactiva (descrita en el punto 3.2.15.3) para hibridar filtros a los que se habían transferido aproximadamente 3.000 colonias de la genoteca pLAFR3-D457R construida en *E. coli* HB101. Tras varias rondas de purificación, se obtuvieron 14 clones positivos. Los clones se aislaron a partir de la placa madre y se procedió a la extracción de los cósmidos correspondientes y su análisis con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Los fragmentos de digestión se separaron en geles de agarosa y se transfirieron a membranas de Nylon. En la Figura 19 se muestran los patrones de digestión y el resultado de la hibridación.

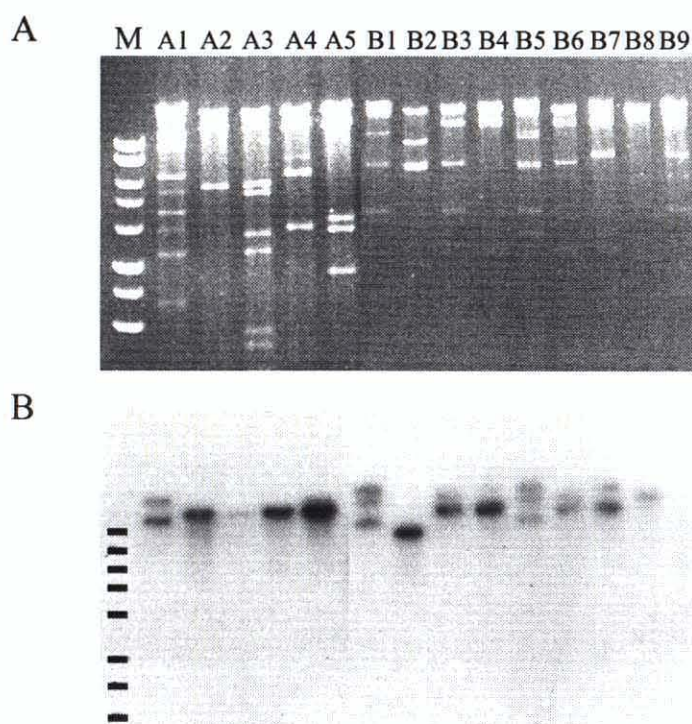


Figura 19. Análisis de cósmidos de la genoteca pLAFR3-cromosómico de *S. maltophilia* D457R construida en *E. coli* HB101 que hibridan con una sonda *smeD*. Panel A, patrón de digestión *EcoRI* y *HindIII*. Panel B, Southern con la sonda *smeD*. M, marcador de peso molecular, de arriba abajo: 10/ 8/ 6/ 5/ 4/ 3/ 2,5 y 2 kpb.

El cósmido A5 presenta un patrón de digestión *EcoRI*+*HindIII* muy parecido a pAS1. Únicamente varía el tamaño de uno de los fragmentos. En pAS1 éste fragmento es el E2 que tiene 9 kpb y contiene el sistema *smeDEF*, mientras que en el cósmido A5 el fragmento es de aproximadamente 15 kpb. A partir de este inserto de 15 kpb se secuenció una región de aproximadamente 1 kpb aguas arriba del gen *smeD*. Se empezó secuenciando con el oligonucleótido *sme27*, diseñado a partir de la secuencia ya conocida de *smeD*, y a medida que se conocía la secuencia se diseñaron cebadores internos para proseguir la secuenciación. El análisis de esta región con el programa CodonPreference puso de manifiesto la presencia de 1 fase abierta de lectura. La zona que codifica esta ORF comprende 657 nucleótidos siendo el producto proteico de 219 amino ácidos y el peso molecular de 24.626. Tal como ocurre con las proteínas reguladoras de diversos sistemas de eflujo (excepto *nfxC* de *mexEFoprN*), esta ORF se transcribe en sentido opuesto (divergente) al operón estructural *smeDEF*. Para mantener un consenso con la nomenclatura en uso, denominamos a esta ORF *smeT*.

4.10.1 Análisis comparativo de la secuencia de SmeT

La comparación con proteínas de la base de datos reveló que esta ORF presenta homología con proteínas reguladoras de la transcripción que se unen a ADN mediante el motivo hélice-giro-hélice (HTH, helix-turn-helix) (Harrison y Aggarwal, 1990). En base a la similitud de esta zona, dichas proteínas se han clasificado en una serie de subfamilias. SmeT muestra homología con componentes de la subfamilia TetR. En la Tabla 13 se muestran los valores de similitud e identidad de SmeT con diversas proteínas de esta subfamilia. Se observa que los porcentajes de identidad y similitud son bajos, incluso en algunos casos no superan el 20% de identidad.

Tabla 13. Comparación de la secuencia aminoacídica de SmeT con proteínas represoras de transcripción.

Proteína	Organismo	Identidad/ Similitud (%)	Identidad/ Similitud (%) motivo HTH	Número acceso ^a	Referencia
AcrR	<i>E.coli</i>	31/51	56/77	sp-P34000	Ma y cols., 1993
EnvR	<i>E.coli</i>	24/45	53/75	sp-P31676	Klein y cols., 1991
TetR	<i>E. coli</i>	< 20	38/50	sp-P03039	Brow y cols., 1985
TetC	<i>E. coli</i>	< 20	37/62	sp-P28815	Schollmeier y Hillen, 1984
AmrR	<i>P. aeruginosa</i>	27/43	50/65	tr-AAF14521	Westbrock- Wadman y cols., 1999
MexZ	<i>P. aeruginosa</i>	< 20	41/47	tr-AAD22453	1
SrpR	<i>P. putida</i>	27/43	59/71	tr-AF061937	1
AmrR	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	28/40	50/62	tr-O87934	1
MtrR	<i>N. gonorrhoeae</i>	26/44	59/77	sp-P39897	Pan y Spratt, 1994
IfeR	<i>A. tumefaciens</i>	29/43	50/67	tr-AF039653	Palumbo y cols., 1998
CprL	<i>S. coelicolor</i>	< 20	50/65	tr-O66122	Onaka y cols., 1998
TarA	<i>Streptomyces. tendae</i>	20/31	47/67	tr-AAF06961	1

^a sp, SwissProt; tr, TrEMBL.

1, las secuencias están disponibles en las bases de datos, aunque no están publicadas.

El alineamiento múltiple de algunas proteínas de la subfamilia TetR con SmeT (Figura 20) pone de manifiesto que la similitud en las secuencia se restringe al motivo HTH y las regiones adyacentes a éste. Basándonos en estos datos, el motivo HTH de SmeT podría estar en la zona comprendida entre los aminoácidos 33 y 52.

SmeT MARKTKED--TQATREGILDAEEACFHEHGVARTTLEMIGARAGYTRGAVYWHFKNKSEVLAAIVERVHLFPMQELERTSTDQRDTPVHDLRAVMIHSFIE
 TetR -----M--NKLQREAVIRTALELLNDVGMGLTTRRLAERLGVQQPALYWHFKNKRALLDALAEAMLTINHTHSTPRDDDDWRSFLKGNACSFRRALLA
 TetC MENKNHQQENFKSTYQSLVNSARILFVEKGYQAVSIDEISGKALVTKGAFYHHFKNKKQLLSACYKQQLIMIDAYITTKT--DLTNGWSALESIFEHYLDY
 AcrR MARKTKQE--AQETRQHILDVALRLFSQQGVSSSTSLGEIATAAGVTRGAIYWHFKNKSDLFSEIWELSESNIGELELEYQAKFPGDPLSVLREILIHVLES
 IfeR MRRTKEQ---AAETGRQILQAAETLFLDKGYDNVSLEEIAALSGVTRGAIHWHFKNKHGLLLLALRNEAQEPFRQFADELSEGRGSASIEKLGDIITDTFKL
 CprL MARQLR---AEQTRATIIGAAADLFDRRGYESTTLSEIVAHAGVTKGALYFHFAAKEDLAHAILEIQSRTSRRLAKDLD-GRGYSSLEALMRLTFGMARL
 :: * : * : : : * : ** * : :

motivo HTH

SmeT LSEDERLRKTME-IMLRSDASA-NTRVLTEMQQAGFRDALDRMERALRR----ARDLGQLREGADPKIAARMQHATVLGVLHGAM--VEPELMDLKR DGM
TetR YRDGARIHAGTRPAAPQMEKADAQLRFLCDAGFSAGDATYALMAISYFTVGAVLEQQASEADAERGEDQLTTSASTMPARLQSAMKIVYEGGPDAAFERG
TetC IIDNNKNLIPIQEVMPPIIGWNE-----LEKISLEYITGKVNAIVSKLIQ-----ENQLKAYDSDVLKN---LLNGWFMHIAIHAKN---LKELADKKGQ-F
AcrR TVTEERRRLLME-IIFHKCEFGEMAVVQQAQRNLCLESYDRIEQLTKH-----CIEAKMLPADLMTTRAAIIMRGYISGLMENWL--FAPQSFDLKKEAR
IfeR LEQDPRQRGLLR-VMMRLDIGL--AEKEEGGENTFPEEMHALFVRIFRA----VERSPGMMKPWTPEKAASMVYAAMGGLITEWA--LRKTEFTLSNDGG
CprL CVQGPNVLRAGLR-LATAGVPVR---PPLPHPFTEWREIATSRLLDVAVRQS---DVHQDIDVDSVAHTLVCSVVGTRVVGTTLEPAG--REPRRLAEMWYIL

SmeT	LALDMTLAAYVKDGVFVPGTVPEPLPEA
TetR	LALIIGGLEKMRLTTNDIEVLKNVDE--
TetC	IAIYRGFLLSLKDK-----
AcrR	DYVAILLEMYLLCPTLRNPATNE----
IfeR	LFIRTLLAGLQRRPTDEN-----
CprL	IRGMVPVTRRRARYVTLAARLEQETGTA

Figura 20. Alineamiento múltiple de SmeT y proteínas reguladoras de la subfamilia TetR. El motivo HTH se indica con una línea continua. *, identidad del 100%; : y ., conservación de grupos más o menos fuertes.

4.11 Comparación de las secuencias de los genes *smeT* de *S. maltophilia* D457 y D457R

Se han descrito que mutaciones (deleciones, inserciones y/o cambios puntuales) en los genes reguladores de los sistemas de eflujo contribuyen a la resistencia antibiótica (Saito y cols., 1999; Shafer y cols., 1995). Para comprobar si la sobreexpresión de *smeDEF* en *S. maltophilia* D457R podría estar relacionada con alguna mutación en *SmeT*, se procedió a amplificar por PCR el gen regulador (159 nucleótidos aguas arriba del codón de inicio, 56 nucleótidos aguas abajo del codón de terminación) a partir de ADN cromosómico de la estirpe parental *S. maltophilia* D457. La amplificación por PCR se llevó a cabo a la temperatura de anillamiento de 50°C empleando los oligonucleótidos *sme42* y *sme43*. El producto de PCR obtenido es del mismo tamaño que el esperado para la cepa *S. maltophilia* D457R (872 nucleótidos) con lo cual descartamos alguna deleción o inserción. Se procedió a la secuenciación del producto de PCR y la comparación de las secuencias de *S. maltophilia* D457 y D457R reveló una mutación puntual en el nucleótido 498 de la región codificante:

Tabla 14. Comparación de las secuencias *smeT* de *S. maltophilia* D457 y D457R.

Cepa	Mutación (posición 498)	Aminoácido (posición 166)	Propiedades físico-químicas
D457	CTG	leucina	hidrófobo alifático
D457R	CAG	glutamina	polar

4.12 Estudio de la expresión de *smeDEF* en aislados clínicos de *S. maltophilia*

Uno de los puntos que nos interesan es estudiar la incidencia de este sistema de multirresistencia en diversos aislados de *S. maltophilia*, ya que la actividad de bombas de extrusión de antibióticos acarrea graves problemas a nivel clínico. Este estudio se realizó con una colección de aislados clínicos procedentes del Hospital de Móstoles (Tabla 2). Para analizar si el sistema *smeDEF* está presente en todos los aislados se realizó una amplificación por PCR de una región de 150 pb del gen *smeD* a partir de ADN cromosómico. En la reacción de PCR se emplearon los oligonucleótidos *sme1* y *sme2* y la temperatura de anillamiento fue de 50°C. La Figura 21 (Panel A) muestra que todos los aislados analizados contienen secuencias amplificables de *smeD*. Una vez comprobada la presencia del sistema, se procedió al análisis de los siguientes parámetros: estudio de los niveles de *SmeF*, determinación de las CMI's a diversos antibióticos, estudio de la acumulación intracelular de quinolonas y detección de transcritos de ARN correspondientes a *smeD*.

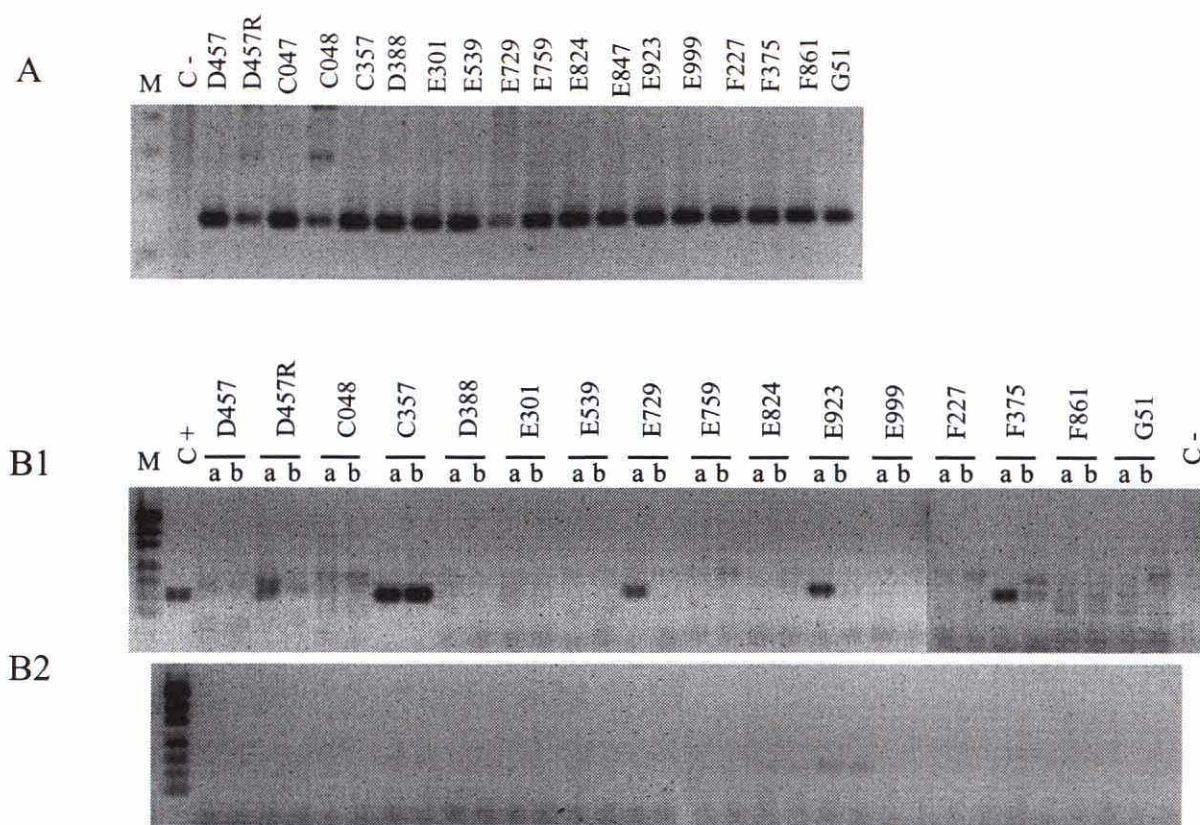


Figura 21. Análisis mediante PCR y RT-PCR de la presencia y expresión del gen *smeD* en aislados clínicos de *S. maltophilia*. El Panel A corresponde a reacciones de PCR. El Panel B1 corresponde a reacciones de RT-PCR a partir de 5 µg de ARN de muestras en fase exponencial (a) y en fase estacionaria (b). El Panel B2 corresponde a reacciones idénticas a las anteriores excepto en que no se añadió la enzima AMV y no se incluyeron los controles + (pAS1) y - (en ausencia de ADN). M, marcadores de peso molecular, Panel A: 400, 300, 200 y 100 pb; Panel B: 404, 331, 242, 190, 157, 147 y 110 pb.

4.12.1 La expresión de SmeF está asociado al fenotipo de multirresistencia tanto en mutantes obtenidos *in vitro* como en aislados clínicos

Para analizar la relevancia de la sobreexpresión de SmeF en mutantes multirresistentes obtenidos por presión antibiótica, se sembró la cepa *S. maltophilia* D457 en placas LB agar suplementadas con tetraciclina (10 µg/ml). Tras incubación a 37°C, se aislaron 11 colonias (R2 a R12) al azar y a partir de cultivos líquidos de éstas se prepararon extractos totales. Las

proteínas de los extractos totales se separaron en geles PAGE-SDS y por análisis de Western se estudió la expresión de SmeF. En la Figura 22 se muestran el gel PAGE-SDS y la inmunodetección con anticuerpo anti-SmeF. Se observa que los 11 mutantes obtenidos por presión antibiótica sobreexpresan la proteína SmeF en comparación con *S. maltophilia* D457.

A continuación, se procedió a analizar la expresión de la proteína SmeF en aislados clínicos procedentes del Hospital de Móstoles (Tabla 2). Las proteínas de extractos totales de cultivos de aproximadamente 16 horas, excepto para los aislados *S. maltophilia* C047 y E847 que fueron de aproximadamente 40 horas debido a sus largos tiempos de generación, se separaron en geles PAGE-SDS (Figura 23, Panel A). Los geles PAGE-SDS se transfirieron a membranas de Nylon y se procedió a la inmunodetección con el suero policlonal anti-SmeF (Figura 23, Panel B). Se observa que la expresión de SmeF es muy variable, los valores de expresión de SmeF van desde muy altos como los observados en los aislados *S. maltophilia* C357 y E923, pasando por niveles medios como en *S. maltophilia* C047 y F375, llegando a niveles muy bajos como en *S. maltophilia* E301 y D457. Incluso, en algunas de las muestras

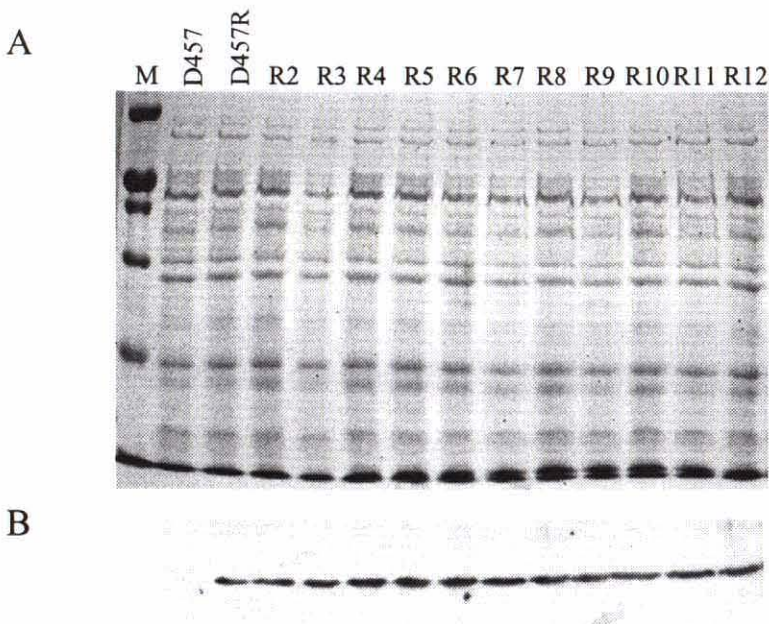


Figura 22. Análisis de la expresión de SmeF en clones obtenidos por selección en tetraciclina a partir de *S. maltophilia* D457. Panel A, gel PAGE-SDS de muestras de 10 µg de proteínas de extractos celulares. Panel B, transferencia de Western e inmunodetección con anticuerpo anti-SmeF. M, marcador de peso molecular, de arriba abajo: 200, 116, 97, 66 y 45 kDa.

no podemos asegurar que SmeF se esté expresando, ya que se observa una banda de inmunoreacción muy tenue.

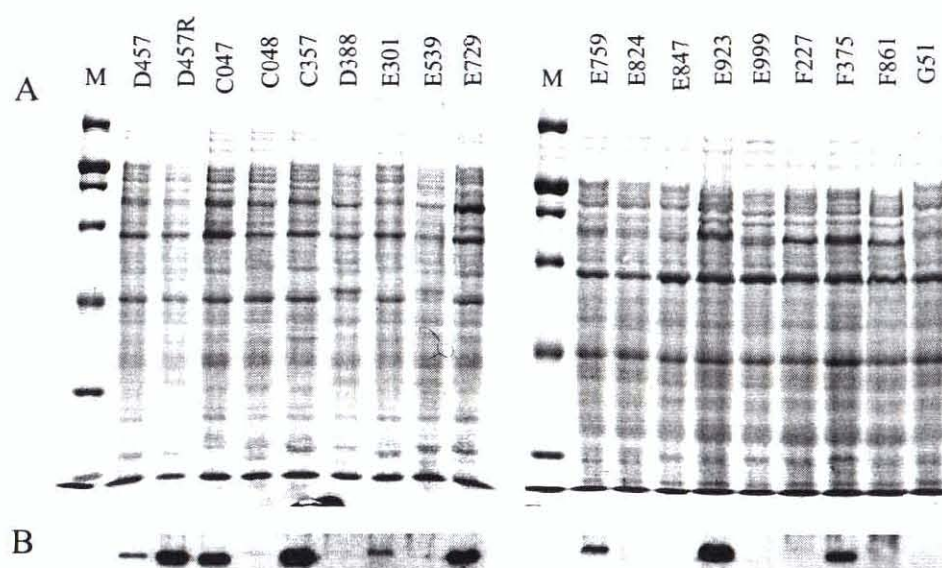


Figura 23. Análisis de la expresión de SmeF en aislados clínicos de *S. maltophilia*. El Panel A corresponde al gel PAGE-SDS de muestras de 10 μ g de proteína de extractos celulares. El Panel B corresponde a transferencia de Western e inmunodetección con suero anti-SmeF. M, marcador de peso molecular, de arriba abajo: 200, 116, 97, 66, 45, 31 y 22 kDa.

Estos datos de expresión de SmeF se pueden comparar con los valores de CMIs (Tabla 5) en cada aislado. En general, se observan unos niveles de resistencia muy elevados para el imipenem y unos niveles más variables para los demás compuestos. Los aislados clínicos de *S. maltophilia* que en el análisis de Western han mostrado expresar SmeF son los que presentan los valores más elevados de resistencia a antibióticos. Esto se observa para la tetraciclina, el cloranfenicol, la eritromicina y para las quinolonas. Por el contrario, los valores de CMIs de amikacina, imipenem y ticarcilina-ácido clavulánico no parecen que estén relacionados con la expresión de SmeF. Esto nos sugiere que la expresión de SmeF está directamente relacionada en aislados clínicos de *S. maltophilia* con un incremento en la resistencia a tetraciclina, cloranfenicol y quinolonas mientras que no está implicada en la resistencia a amikacina, imipenem ni ticarcilina-ácido clavulánico. Estos datos concuerdan con la especificidad del sistema SmeDEF expresado en el derivado multirresistente D457R obtenido en el laboratorio y en las distintas cepas de *E. coli* que contienen los diferentes plásmidos recombinantes conteniendo *smeDEF*.

4.12.2 Acumulación intracelular de quinolonas

Para confirmar la relación directa entre la expresión de SmeF y los fenotipos de multirresistencia y comprobar la implicación de un sistema de eflujo en dicho fenotipo, se procedió a realizar ensayos de acumulación intracelular de norfloxacin, ofloxacin y ciprofloxacina. Como en el caso de las cepas *S. maltophilia* D457 y su derivado multirresistente D457R, la acumulación se realizó en dos condiciones: en ausencia y en presencia del desacoplante del gradiente de protones de la membrana CCCP. Los resultados de estos ensayos se muestran en la Figura 24. Hay que destacar que, excepto en el aislado *S. maltophilia* E824, los niveles de acumulación intracelular aumentan de forma notable al inhibir el gradiente de protones. Esto indica la presencia de sistemas de bombeo activo en la mayoría de los aislados analizados. Además al tratarse de cepas distintas, las posibles diferencias en la permeabilidad de la membrana se reflejarían en los ensayos de acumulación intracelular. Con los datos obtenidos no podemos relacionar los niveles de acumulación con la ausencia o presencia de SmeF.

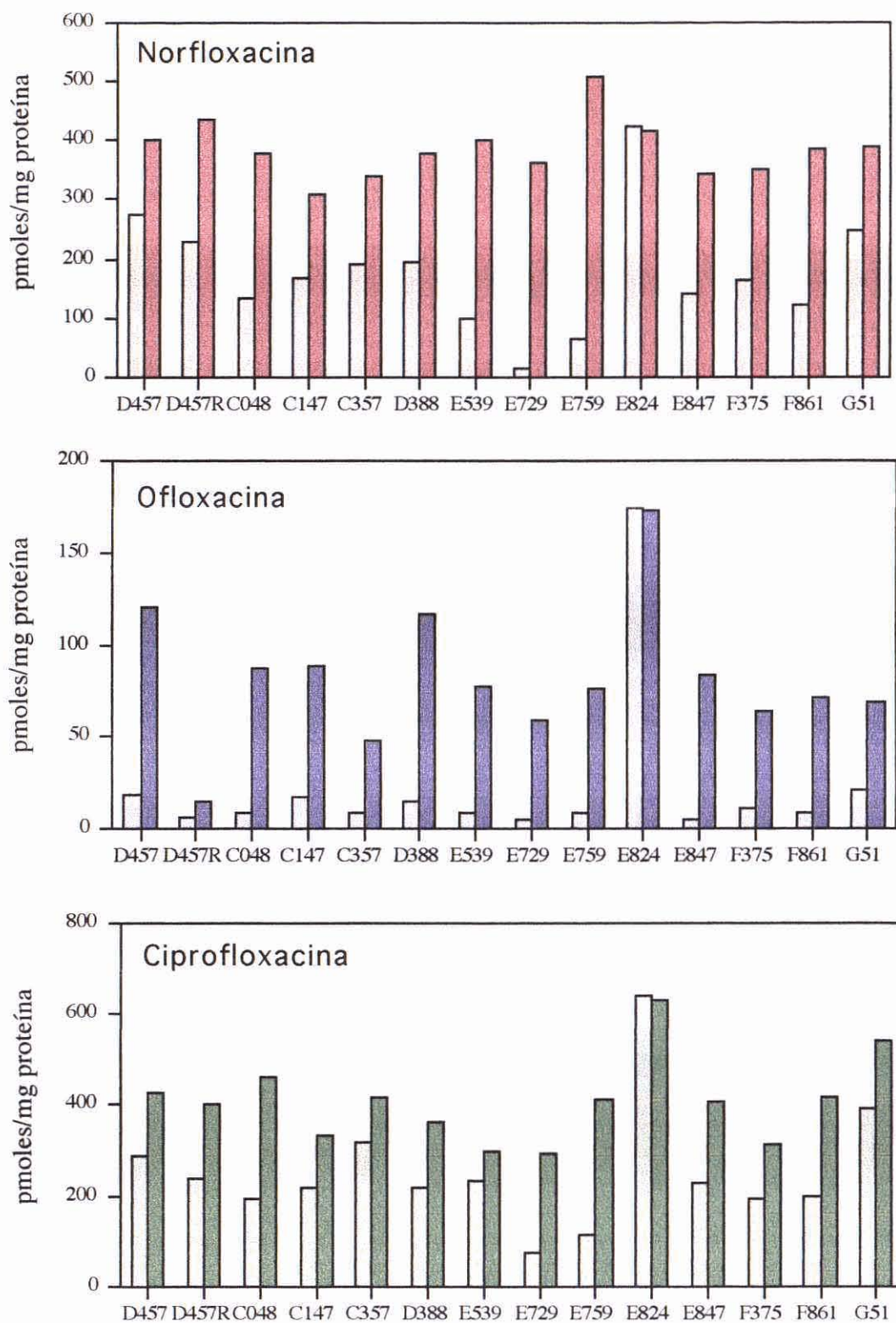


Figura 24. Acumulación intracelular de quinolonas por aislados clínicos de *S. maltophilia*. Las barras con el fondo oscuro corresponden al ensayo en presencia de CCCP.

4.12.3 RT-PCR

Para detectar la presencia de transcritos *smeD* se procedió a realizar una transcripción reversa de ARN de muestras procedentes de cultivos crecidos hasta D.O.₆₀₀ de 0,2 y de 1,2. A continuación, y a partir del ADNc obtenido, se amplificó por PCR una zona interna del gen *smeD*. La Figura 21 (Panel B) muestra el resultado de este análisis. Únicamente se detectan productos de RT-PCR del tamaño esperado en las muestras de las cepas que expresan SmeF. Además, la única muestra de O.D. ₆₀₀ de 1,2 en la que se detecta el producto génico corresponde a la cepa *S. maltophilia* C357. Esta cepa, presenta los niveles de expresión de SmeF y de resistencia más altos. Estos datos confirman la relación directa entre la expresión del sistema *smeDEF* y del fenotipo de multirresistencia en aislados de *S. maltophilia*.

4.13 Caracterización fisiológica: coste asociado al fenotipo de multirresistencia

Diversos estudios apuntan a que existe un coste biológico asociado al fenotipo de resistencia (Andersson y Levin, 1999), de forma que en un ambiente sin antibióticos las cepas resistentes son desplazadas por las cepas silvestres. Debido a esto, procedimos a estudiar diversos parámetros indicadores del estado fisiológico de *S. maltophilia* D457 y D457R.

4.13.1 Estudio preliminar: tiempo de generación, tamaño de colonia y ufc/colonia

Las tasas de crecimiento se determinaron por medidas de D.O.₆₀₀ de cultivos crecidos en LB a 37°C. El tiempo de generación de *S. maltophilia* D457 es de 39 min mientras que de *S. maltophilia* D457R es de 47 min. También se observaron diferencias en el tamaño de colonias crecidas en placas de LB. En la Figura 25 se muestra el aspecto de colonias de *S. maltophilia* D457 y D457R tras aproximadamente 16 horas de incubación. Se observa que las colonias correspondientes al derivado multirresistente son significativamente más pequeñas que las del salvaje. Este efecto se observa de forma más clara en placas sembradas con un cultivo mixto de *S. maltophilia* D457 y D457R. Este dato fue confirmado a partir del análisis de varios mutantes resistentes (R2 a R12) obtenidos como se describe en el apartado 4.12.1. Los 11 clones también presentan un tamaño de colonia inferior a *S. maltophilia* D457. Para determinar el número de unidades formadoras de colonia (ufc) por colonia, las colonias crecidas en medio LB sólido de *S. maltophilia* D457, D457R y de otros 4 clones (R2, R3, R4 y R5) se resuspendieron en tampón PBS. Se realizaron diluciones seriadas en tampón PBS y éstas se sembraron en medio LB sólido. Las placas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 9 horas y se determinaron las ufc/colonia:

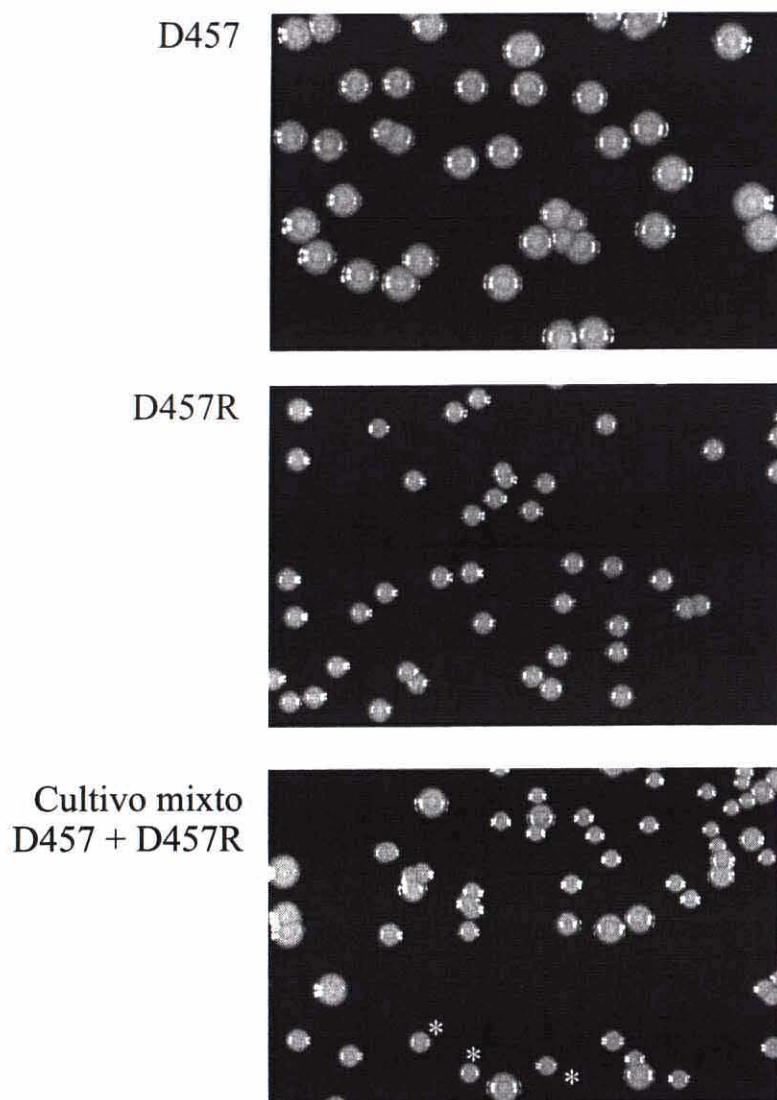


Figura 25. Colonias de *S. maltophilia* D457 y D457R crecidas en medio LB sólido tras 16 horas de incubación a 37° C. En el caso del cultivo mixto, con un asterisco se indican colonias que posiblemente corresponden al aislado *S. maltophilia* D457R

Tabla 15. Determinación de ufc/colonia en cepas de *S. maltophilia*.

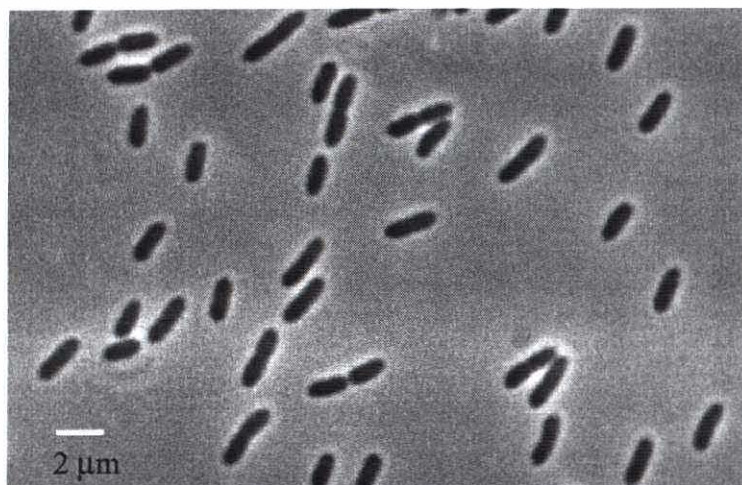
Cepa <i>S. maltophilia</i>	ufc/colonia
D457	$3,0 \times 10^{10}$
D457R	$0,9 \times 10^{10}$
R2	$2,1 \times 10^{10}$
R3	$1,1 \times 10^{10}$
R4	$0,8 \times 10^{10}$
R5	$1,4 \times 10^{10}$

Estos datos indican que el menor tamaño de colonia observado, se debe a la presencia de un menor número de células en las colonias de los mutantes multirresistentes en comparación con la cepa parental sensible.

4.13.2 Tamaño celular

Para estudiar este aspecto se analizaron dos parámetros: medida de la longitudes celulares y comparación del volumen celular relativo. La Figura 26 muestra imágenes obtenidas a 1000x aumentos de cultivos en fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0,4 a 0,5). La forma bacilar se mantiene en las dos cepas, aunque se observa claramente la disminución del tamaño de *S. maltophilia* D457R con respecto a *S. maltophilia* D457. Para el seguimiento del volumen celular a lo largo de la curva de crecimiento se analizaron muestras de cultivo en el contador y canalizador de Coutler. La Figura 27 muestra el resultado de dos experimentos. En el eje de abscisas, la mediana corresponde al volumen relativo en el cual la mitad de la población de la muestra se encuentra por encima de ese valor y la otra mitad por debajo de ese valor. La diferencia en el volumen relativo entre *S. maltophilia* D457 y D457R se empieza a observar a partir de las muestras correspondientes a una D.O.₆₀₀ de 0,1. Esta diferencia se mantiene hasta por lo menos el principio de la fase estacionaria. Aunque no conocemos el mecanismo responsable de tal efecto, estos datos indican que el fenotipo multirresistente está asociado a un cambio morfológico tan relevante como es el tamaño celular.

D457



D457R

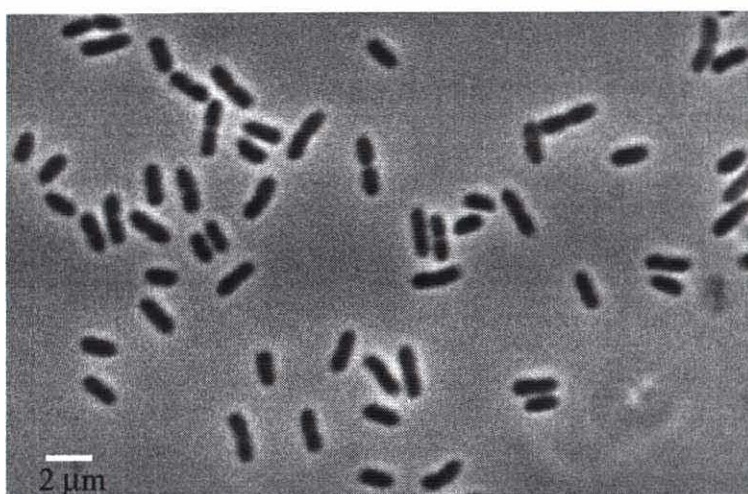


Figura 26. Imágenes obtenidas a una amplificación de 1000x de cultivos exponenciales de *S. maltophilia* D457 y D457R. Se observa la reducción de tamaño de las células del mutante multirresistente comparado con la cepa parental.

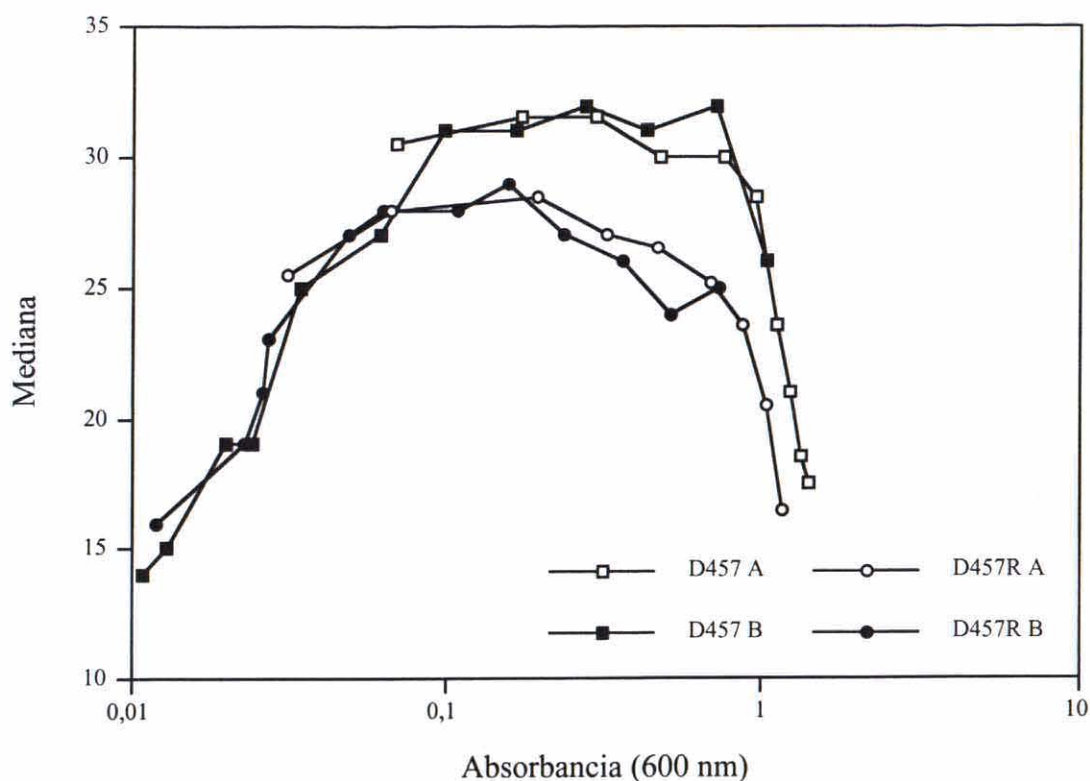


Figura 27. Variación del volumen celular a lo largo de las curvas de crecimiento de *S. maltophilia* D457 y D457R. Las cepas se crecieron en medio LB a 37° C. Los valores de A y B corresponden a dos experimentos independientes.

4.13.3 Ensayos de competición

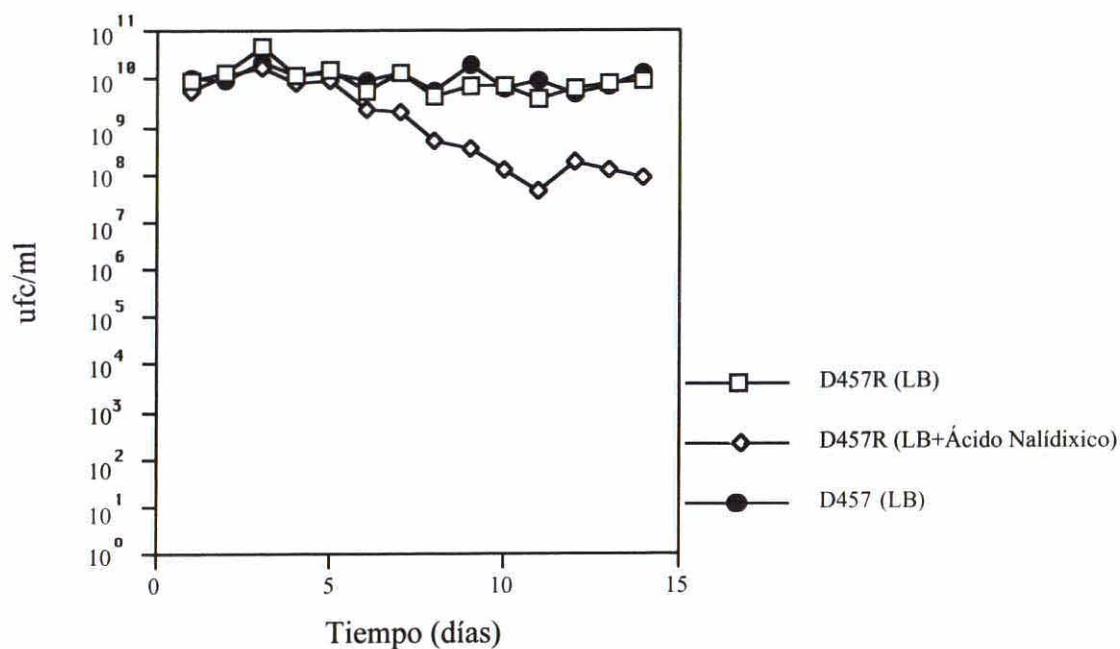
La capacidad de competencia ecológica (*fitness*) de *S. maltophilia* D457 y D457R fue ensayada mediante experimentos de competición en medio líquido LB. Para ello se partió de un cultivo mixto con 10^6 células de cada cepa y cada 24 horas se diluyó a razón de 1:1000 en medio LB fresco. Cada 24 horas y durante 14 días se hizo una determinación de la concentración de células de cada cepa mediante el recuento ufc en placas LB y LB suplementadas con ácido nalidíxico (15 µg/ml). La concentración de ácido nalidíxico que se ha empleado como selección está basada en las CMI's de este compuesto en *S. maltophilia* D457 y D457R. Esta es de 8 µg/ml en *S. maltophilia* D457 y de 128 µg/ml en *S. maltophilia* D457R. A la concentración utilizada, en las placas con antibiótico sólo crece *S. maltophilia* D457R, mientras que en las placas sin antibiótico crecen ambas cepas. Como control se siguió en paralelo el crecimiento de cultivos puros de *S. maltophilia* D457 y D457R

realizándose las mismas determinaciones. La Figura 28 (Panel A) muestra el resultado de los experimentos control. Se observa que las ufc/ml de *S. maltophilia* D457R en el cultivo puro decaen a partir del día 5 en el medio suplementado con el antibiótico. Este efecto se tuvo en cuenta al determinar las ufc/ml de *S. maltophilia* D457R en el cultivo mixto. La determinación de las ufc/ml de cada cepa en el cultivo mixto (Figura 28, Panel B) puso de manifiesto que *S. maltophilia* D457 es capaz de desplazar a su derivado multirresistente D457R. Este resultado indica que *S. maltophilia* D457R se encuentra en desventaja fisiológica frente a *S. maltophilia* D457. El descenso en las ufc/ml de *S. maltophilia* D457R en el cultivo puro en el medio suplementado podría indicar que las sucesivas diluciones en el medio líquido LB permiten la selección de mutantes revertientes sensibles que están en mejores condiciones fisiológicas que la cepa original.

4.13.4 Estado energético

Para determinar el estado energético se procedió a analizar los niveles de ATP y de ADP de *S. maltophilia* D457 y D457R. La Figura 29 muestra la concentración (moles/mg proteína) de ATP y de ADP para cultivos de *S. maltophilia* D457 y D457R en fase exponencial (D.O.₆₀₀ entre 0,4 a 0,5) e inicio de la fase estacionaria (D.O.₆₀₀ de 1,2). En fase exponencial los valores de ATP y de ADP en la cepa salvaje son más altos que en el derivado multirresistente. Además la relación ATP/ADP está invertida en *S. maltophilia* D457R, mientras que en el salvaje la relación es de 1,4 en el derivado multirresistente es de 0,6. En fase estacionaria los niveles de ATP en las dos cepas se asemejan. En el caso del ADP siguen siendo más bajo para *S. maltophilia* D457R. Esto indica que en la fase en la cual hay un mayor requerimiento de energía (fase exponencial) la disponibilidad de ATP es menor en D457R.

A



B

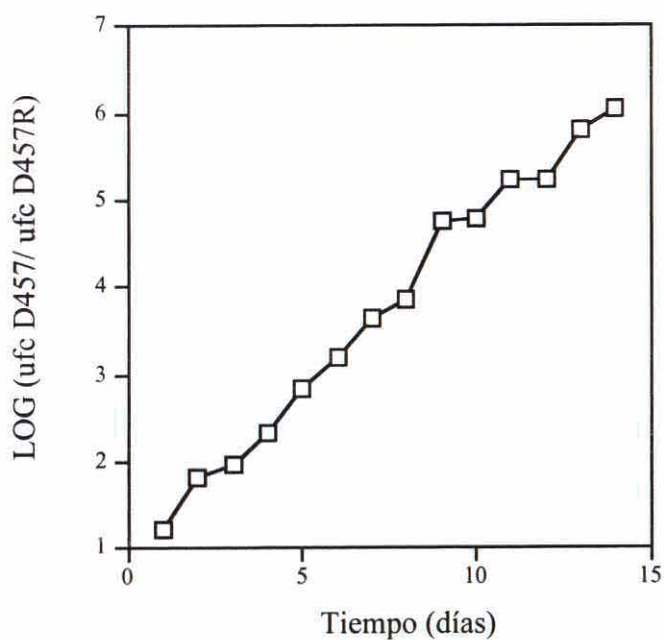


Figura 28. Ensayos de competición entre *S. maltophilia* D457 y D457R. En el Panel A se muestran los resultados de los experimentos control (cultivos puros). En el Panel B se muestra la relación entre las ufc de *S. maltophilia* D457 y D457R en el cultivo mixto.

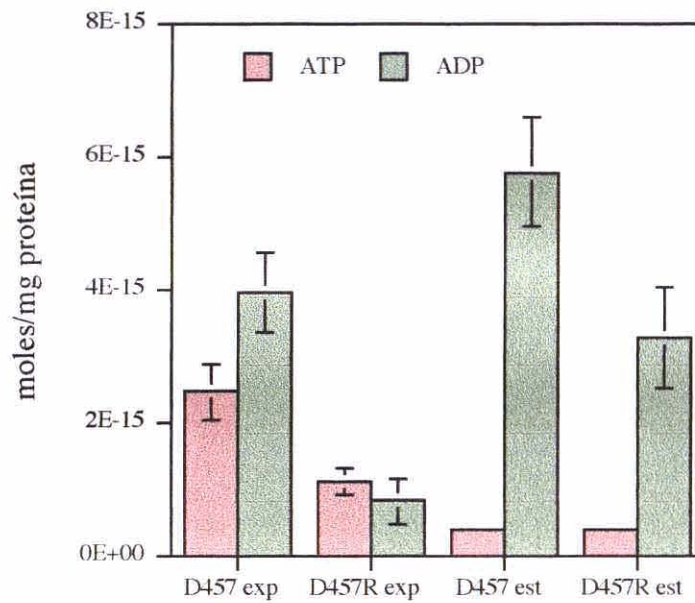
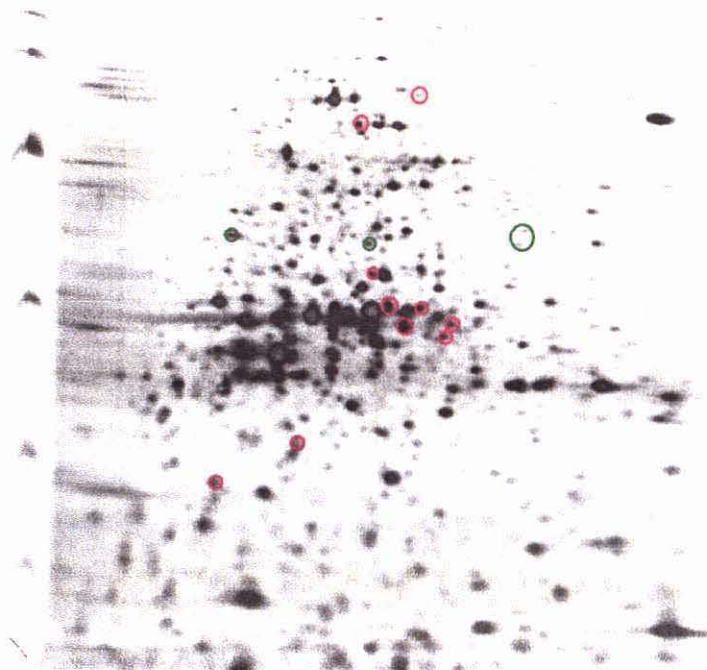


Figura 29. Concentración de ATP y ADP de cultivos de *S. maltophilia* D457 y D457R en fase exponencial (exp) y fase estacionaria (est). En fase exponencial de crecimiento, se observa una reducción significativa en la concentración de ATP y de ADP en las muestras de *S. maltophilia* D457R comparado con la cepa parental D457. En fase estacionaria, los niveles de ATP se igualan aunque no ocurre lo mismo con la concentración de ADP, ésta es inferior en el mutante multirresistente.

4.14. Análisis de los proteomas de *S. maltophilia* D457 y D457R

Los ensayos de caracterización fisiológica (apartado 4.13) indican que el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R tiene alterado el estado fisiológico, el estado energético y su competencia ecológica frente a la estirpe parental D457. Dado que estas variaciones, tanto en tamaño, como en velocidad de crecimiento, o estado energético de la célula solo pueden explicarse en base a un efecto generalizado en el metabolismo celular, procedimos a analizar como una primera aproximación los proteomas de ambas estirpes bacteriana en el momento del crecimiento en el que se observaban diferencias fisiológicas más relevantes, es decir en mitad de fase exponencial de crecimiento. Para tal análisis, procedimos a comparar, mediante el uso de geles bidimensionales, la expresión de proteínas de los extractos celulares de *S. maltophilia* D457 y D457R procedentes de cultivos en fase de crecimiento exponencial. La Figura 30, muestra los geles tras una tinción con nitrato de plata. Cuando se comparan ambos geles, se detectan diferencias en los proteomas de *S. maltophilia* 457 y *S. maltophilia* 457R. Estas diferencias son, tanto en los niveles de expresión, como en la movilidad relativa de un cierto número de proteínas. Es de notar, que el efecto de la mutación puntual en el gen regulador *smeT* que constituye la base de esta memoria de doctorado comporta tanto un aumento, como una disminución en los niveles de expresión de un número considerable de proteínas de *S. maltophilia*.

D457



D457R

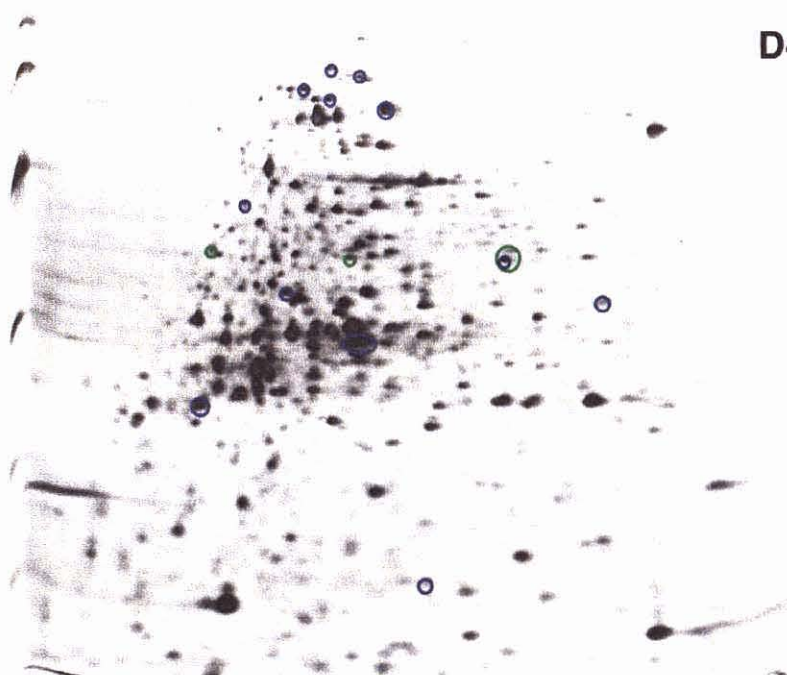


Figura 30. análisis de los proteomas de *S. maltophilia* D457 y D457R. las muestras proceden de cultivos en fase exponencial de crecimiento. en rojo se indican aquellas proteínas cuya expresión es mas elevada en *S. maltophilia* D457. En azul aquellas cuya expresión es mas elevada en DD457R, y en verde aquellas cuya movilidad cambia entre una y otra cepa.

5. Discusión

Las infecciones por patógenos oportunistas son un problema muy importante en el ambiente hospitalario (Bergogne-Berezin y cols., 1993). La rapidez con que se detectan cepas resistentes a nuevos agentes microbianos es alarmante, e incluso existen infecciones prácticamente intratables utilizando los antibióticos convencionales (Chambers, 1997; Guerrero y cols., 1997; Hiramatsu, 1998; Lessing y Raftery, 1998). Esta situación no tiende a mejorar debido a una serie de factores: envejecimiento de la población, aumento del número de pacientes inmunodeprimidos y utilización de técnicas de medicina agresivas (implantación de catéteres, transplantes, etc.). A partir de principios de los años 90, *S. maltophilia* ha emergido como un patógeno oportunista importante debido principalmente al carácter multirresistente que presenta (Smit y cols., 1994; Vartivarian y cols., 1994). En nuestro trabajo el análisis de las CMIs a antibióticos de diversas cepas clínicas de *S. maltophilia* aisladas entre los años 1990 y 1994 confirma que la baja susceptibilidad es un carácter generalizado (Tabla 5). Aunque no está claro el origen de este fenotipo, creemos que el hábitat natural de *S. maltophilia*, la rizosfera, es muy importante a la hora de seleccionar el mismo. De hecho, la resistencia intrínseca es común en otras especies bacterianas como *P. aeruginosa* (Rella y Haas, 1982; Masuda y Ohya, 1992) o *B. cepacia* (Burns y cols., 1989) también con un origen medioambiental. El hecho de que los distintos aislados de una especie como éstas sean resistentes antes de entrar en contacto con los antibióticos en el medio hospitalario, indica que el fenotipo de resistencia es debido a la selección de otro tipo de carácter, y la resistencia a los antibióticos es subsidiaria. Este tipo de mecanismo ha sido analizado en otros casos como un mecanismo de evolución que permitiría la adquisición rápida de nuevas capacidades adaptativas por parte de organismos expuestos a cambios ambientales rápidos (Brosius y Gould, 1992).

El ambiente rico en nutrientes de la rizosfera potencialmente permitiría el crecimiento de una enorme diversidad de microorganismos, y de hecho la permite. En este ecosistema, la capacidad de inhibir el crecimiento de otros microorganismos y la de protegerse mediante mecanismos de resistencia a compuestos tóxicos son clave en la supervivencia de la especie al suponer una ventaja ecológica en la competición con otros microorganismos potencialmente capaces de ocupar el mismo nicho ecológico. De hecho se ha determinado que *S. maltophilia* produce un antifúngico (maltofilina) (Jakobi y cols., 1996) y se ha caracterizado la presencia de genes de resistencia a antibacterianos (β -lactámicos y aminoglicósidos) producidos de modo generalizado por cepas de *S. maltophilia* (Walsh y cols., 1994; Walsh y cols., 1997; Lambert y cols., 1999). Por otra parte, el fenotipo multirresistente no está únicamente restringido a cepas de origen clínico sino también a aislados de origen ambiental (Berg y cols., 1999). En éste estudio tanto las cepas de origen

clínico como las de origen ambiental presentan valores de resistencia elevada a diversos compuestos antimicrobianos y no se pueden segregar los dos grupos de cepas en base a los patrones de resistencia. Estos datos indican que el fenotipo de multirresistencia típico de cepas de *S. maltophilia* es una característica intrínseca de la especie. A mediados-finales de los años 90 los sistemas de eflujo de drogas han sido identificados como los mecanismos más importantes en la multirresistencia intrínseca de bacterias Gram-negativas (Yoneyama y cols., 1997; Takiff y cols., 1996; Okusu y cols., 1996). El funcionamiento de bombas de eflujo en combinación con la baja permeabilidad conferida por la envoltura celular de bacterias Gram-negativas es un mecanismo eficaz para la resistencia a drogas de diversas clases (Nikaido, 1994). Los sistemas de bombeo de drogas están ampliamente distribuidos por todos los organismos (Saier y cols., 1998), sin embargo el carácter de inespecificidad por el sustrato adquiere una importancia notable en bacterias Gram-negativas. La baja permeabilidad conferida por la envoltura celular en bacterias Gram-negativas conlleva que la entrada de diversos solutos (incluyendo antibióticos) ocurra a velocidades bajas (Nikaido, 1994). Esto permite que los sistemas de bombeo, aún no siendo muy activos para un determinado compuesto, puedan sobrepasar la velocidad de entrada y por lo tanto ser eficaces. Tal y como se indica en la Introducción, los sistemas de bombeo múltiple de drogas son relevantes tanto en la resistencia intrínseca como en la resistencia adquirida bajo presión selectiva a antibióticos.

Con estos antecedentes nos propusimos a estudiar la presencia de sistemas de bombeo en cepas de *S. maltophilia*. La obtención de mutantes multirresistentes *in vitro* por selección antibiótica ha sido descrita en diversas ocasiones para distintas especies bacterianas (Rella y Haas, 1982; Masuda y Ohya, 1992; Kohler y cols., 1997). Estos mutantes se caracterizan, aparte del fenotipo de multirresistencia, por la sobreexpresión de proteínas de membrana externa. Posteriormente, se ha comprobado que éstas forman parte de sistemas activos de bombeo de compuestos (Gotoh y cols., 1995; Poole y cols., 1996; Kohler y cols., 1997). En el caso de *S. maltophilia*, tanto nuestro los datos presentados en esta memoria, como resultados del grupo de K. Poole (Zhang y cols., 2000) han descrito que es muy sencillo obtener mutantes multirresistentes bajo presión selectiva en el laboratorio. En nuestro estudio, a partir del aislado *S. maltophilia* D457 por selección con tetraciclina se obtuvieron clones resistentes con una frecuencia de $1,9 \times 10^{-6}$. Al igual que los mutantes multirresistentes *nalB* (Rella y Haas, 1982; Masuda y Ohya, 1992), *nfxB* (Masuda y cols., 1996) y *nfxC* (Fukuda y cols., 1995; Masuda y cols., 1995) de *P. aeruginosa*, el mutante *S. maltophilia* D457R sobreexpresa una proteína de membrana externa (SmeF) y presenta resistencia cruzada a distintos antibióticos. Recientemente, se ha descrito en *S. maltophilia* que la selección *in vitro* en presencia de distintos antibióticos da lugar a mutantes con diversos fenotipos de multirresistencia (Zhang y cols., 2000). Al igual que *S. maltophilia* D457R, sobreexpresan

proteínas de membrana externa de alrededor de 50 kDa. En este mismo trabajo, ensayos inmunológicos indican que la selección de los mutantes multirresistentes con distintos antibióticos conlleva a la sobreexpresión de distintas proteínas de membrana externa inmunoreactivas a anticuerpos desarrollados contra las proteínas de membrana externa implicadas en los sistemas de bombeo de *P. aeruginosa*. Estas proteínas de *S. maltophilia* podrían formar parte de distintos sistemas de bombeo. La presencia de diversos sistemas de bombeo se ha descrito en diversos microorganismos, y dentro de la misma especie algunos de estos mecanismos son más relevantes que otros (Kohler y cols., 1997; Alonso y cols., 1999). En nuestro trabajo, los ensayos de acumulación intracelular de diversos compuestos en *S. maltophilia* D457 y D457R indican que ambas cepas poseen sistemas de bombeo dependientes de la fuerza motriz de protones, a pesar de que para algunos de ellos el bombeo era más eficaz en el caso del mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R. Estos resultados, así como lo derivados del análisis de bombeo de quinolonas por aislados clínicos de *S. maltophilia* indican que todas las estirpes son capaces de expresar de expulsar de un modo activo antibióticos, y que tienen por tanto sistemas funcionales de bombeo activo de drogas. De hecho, posteriormente comprobamos por inmunodetección con un anticuerpo específico de SmeF que la cepa parental *S. maltophilia* D457 expresa dicha proteína de membrana externa aunque a un nivel muy inferior al detectado para el derivado multirresistente *S. maltophilia* D457R.

Para clonar los sistemas de bombeo de *S. maltophilia* se empleó un mutante multirresistente que sobreexpresa SmeF. Se preparó una genoteca genómica de *S. maltophilia* D457R en el vector pUC19 y ésta se expresó en un huésped con fenotipo de hipersensibilidad. Como huésped empleamos la cepa *E. coli* KZM120 que tiene una delección en el operón *acrAB* (Ma y cols., 1995) y por complementación de la resistencia a eritromicina se aisló una colonia. El análisis de la secuencia contenida en el plásmido recombinante nos ha permitido identificar genes de resistencia a eritromicina y a metales pesados con un posible origen Gram-positivo. La identificación y caracterización de los genes presentes en pERY1 se ha hecho en aislados de *S. aureus* procedentes de zonas geográficas distantes (Japón y Estados Unidos) y en años distintos. El origen Gram-positivo de los genes clonados en pERY1 se refuerza con el análisis del contenido de G+C. Ésta es del 35,1% y se diferencia significativamente del contenido G+C del 63-67,5% descrito para cepas de *S. maltophilia* (Denton y Kerr, 1998), asemejándose más a bacterias Gram-positivas como *S. aureus*. De hecho, la secuencia de inserción IS257 se encuentra ampliamente distribuida en el genoma de diversas cepas de *S. aureus* IS257 (Rouch y Skurray, 1989). La transferencia genética entre bacterias Gram-positivas y bacterias Gram-negativas ha sido descrita como un mecanismo importante de adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Courvalin, 1994). Para que esta situación se dé *in vivo* las distintas especies deberían ocupar el mismo nicho ecológico.

La cepa *S. maltophilia* D457 proviene de una muestra del tracto respiratorio, en éste microambiente pueden estar presentes cepas de *S. aureus* (van Alphen y cols., 1995). Por lo tanto, existe la posibilidad de que la región clonada haya sido adquirida por *S. maltophilia*, mediante transmisión horizontal, a partir de un cepa de *S. aureus* presente en el tracto respiratorio del paciente.

Debido a que con ésta primera aproximación no se consiguió clonar ningún determinante de multirresistencia, como era nuestro objetivo, se preparó otra genoteca genómica de *S. maltophilia* D457R en el cósmido pLAFR3. Éste vector permite insertos de hasta 30 kpb y es de bajo número de copias. La genoteca fue empaquetada en una mezcla de bacteriófagos λ y ésta se utilizó para infectar un huésped con fenotipo de hipersensibilidad. Como huésped empleamos la cepa *E. coli* AA81 que tiene una delección en el operón *acrAB* y por complementación de la resistencia a eritromicina se aisló una colonia. El análisis de la secuencia del inserto contenido en el cósmido recombinante ha permitido la caracterización del primer sistema de eflujo de antibióticos de *S. maltophilia*, *smeDEF* (*Stenotrophomonas* multidrug efflux). El sistema *SmeDEF* media la resistencia a tetraciclina, cloranfenicol, eritromicina y quinolonas, tanto cuando se sobreexpresa en su especie bacteriana de origen, *S. maltophilia*, como cuando se expresa, a partir de un plásmido recombinante, en un huésped heterólogo, como *E. coli*. No parece que medie la resistencia a β -lactámicos ni a aminoglicósidos. Los ensayos de acumulación intracelular de norfloxacin y de bromuro de etidio en una cepa de *E. coli* Δ *acrAB* que expresa el sistema *SmeDEF* indican que dicha expresión produce una importante reducción en la acumulación de estos compuestos, y que ésta menor acumulación en la estirpe que expresa *SmeDEF* es dependiente de la fuerza motriz de protones. De hecho, el análisis de la secuencia de *smeDEF* y su comparación con proteínas de la base de datos muestran porcentajes de identidad muy significativos con diversos componentes de sistemas de eflujo acoplados al potencial de protones de la membrana (Paulsen y cols., 1996). Al igual que ocurre con otros sistemas de eflujo de bacterias Gram-negativas, los análisis presentados en esta memoria, indican de que el sistema *smeDEF* está presente en todos los aislados de *S. maltophilia* independientemente de los niveles de resistencia de la estirpe. Esto sugiere que puede contribuir a la resistencia intrínseca de ésta especie bacteriana, de igual modo a cómo se ha descrito para otros sistemas semejantes. Como se discutirá con más adelante, también puede contribuir a la resistencia adquirida de algunos aislados de *S. maltophilia*, como consecuencia de mutaciones que desrepriman la expresión de *smeDEF*.

La comparación de las secuencias con proteínas de las bases de datos EMBL y SwissProt nos ha permitido asignar a cada producto génico una función, proponer su localización subcelular e identificar posibles motivos de interés. En este sentido, *SmeE*

muestra homología con proteínas de la familia RND (Paulsen y cols., 1996), que agrupa a proteínas transportadoras dependientes de la fuerza motriz de protones. El análisis de hidropatía de la secuencia de SmeE indica la existencia de 12 posibles segmentos hidrofóbicos que atraviesan la membrana (TMS) y de 2 zonas hidrofílicas características de los miembros de la familia RND. SmeD y SmeF muestran homología con proteínas de las familias MFP (Dinh y cols., 1994) y OMF (Paulsen y cols., 1997), respectivamente. Las proteínas de estas dos familias implicados en los sistemas de eflujo de antibióticos se caracterizan por poseer una secuencia de péptido señal (Hayashi y Wu, 1990). En procariotas, las lipoproteínas ubicadas en la membrana se sintetizan con un péptido señal precursor que es reconocido y procesado por una peptidasa específica de tipo II. La peptidasa de tipo II reconoce el motivo conservado y corta aguas arriba del residuo de cisteína. A esta cisteína, que debe de estar situada entre las posiciones 15 y 35, se une un lípido ácido graso-glicérido. El análisis de los fragmentos tripticos de la proteína de membrana externa sobreexpresada en *S. maltophilia* D457R por espectrometría de masas indica que esta proteína (denominada anteriormente Omp54) es la misma que SmeF. Por otra parte, no se detectaron los fragmentos que comprenden el motivo péptido de señal precursor. La ausencia de esta región sugiere que SmeF es efectivamente procesada. El componente transportador SmeE ha mostrado los valores de similitud más elevados con los miembros de su familia (RND), que SmeD y SmeF con los miembros de MFP y OMF, respectivamente. Para SmeE son aproximadamente de 60% de identidad y de 72% de similitud con AcrB y AcrF de *E. coli* y MexB de *P. aeruginosa*, mientras que los componentes MFP de estos sistemas muestran valores del 48% de identidad y del 60% de similitud. En el caso de los componentes OMF, OprM de *P. aeruginosa* muestra 40% de identidad y 56% de similitud con SmeF. A pesar de que los valores de identidad entre *smeD* y *smeE* con *acrA* y *acrB* son bastantes elevados (48% y 61%, respectivamente), no ocurre lo mismo con los componentes OMF de ambos sistemas, de tal modo que la homología entre SmeF y TolC es tan solo del 21% de identidad y el 37% de similitud. Ésta homología es tan baja que la proteína TolC ni tan siquiera aparece cuando se realizan búsquedas por homología en las bases de datos de secuencias. La mayor conservación de las proteínas transportadoras de los sistemas de eflujo sugiere que la función que éstas realizan permiten menos cambios y en su evolución han divergido menos que los otros dos componentes estructurales (MFP y OMF). Por otra parte, el hecho de que la homología de las proteínas OMF sea tan baja, así como que en algunos casos (por ejemplo TolC) su gen codificante se encuentre en una zona cromosómica diferente al de los otros componentes estructurales de los sistemas de bombeo, sugieren que la adquisición de estos determinantes ha transcurrido en dos pasos: por una parte se adquirieron los genes RND y MFP, y por otra parte (incluso con una localización diferente) los genes OMF. Por otra parte, la baja homología que presentan entre sí las secuencias de las proteínas reguladoras de estos sistemas indican que también podrían haber sido adquiridas, e incluídas en los operones en un

evento diferente (de Lorenzo y Perez-Martin, 1996) Este tipo evolución en la cual distintos elementos son incorporados para formar finalmente un operón/determinante complejo, ha podido contribuir a la explosión evolutiva que significa la existencia de un número tan elevado de sistemas de eflujo en las especies bacterianas.

La expresión del sistema *smeDEF* ha sido analizada en mutantes multirresistentes obtenidos *in vitro* por selección con tetraciclina y en aislados clínicos de *S. maltophilia*. En el caso de los mutantes seleccionados *in vitro*, todos sobreexpresan la proteína de membrana externa SmeF. Esto indica: 1) la presión antibiótica (al menos con tetraciclina) se puede considerar un factor de riesgo ya que conlleva la selección de un fenotipo de multirresistencia, 2) el sistema SmeDEF es esencial para el fenotipo de multirresistencia adquirida de *S. maltophilia*. Los análisis de las CMI's y de la expresión del sistema *smeDEF* en aislados clínicos ha permitido confirmar que éste sistema está directamente asociado al fenotipo multirresistente y que *in vivo* es un mecanismo importante en la adquisición de resistencia. El hecho de que los aislados clínicos con valores de resistencia más elevados sobreexpresan SmeDEF sugiere que es el sistema de eflujo con más relevancia a nivel clínico. En el caso de *P. aeruginosa* y *E. coli*, en los que se han clonado y caracterizado diversos sistemas de eflujo de drogas, los sistemas mayoritarios y/o de importancia más relevante en la contribución del fenotipo intrínseco son *mexABoprM* (Kohler y cols., 1997) y *acrAB-tolC* (Ma y cols., 1995), respectivamente. Sin embargo, tanto en *P. aeruginosa* como en *E. coli* la sobreexpresión de los sistemas de eflujo mayoritarios no son suficientes para alcanzar niveles de resistencia de relevancia clínica a quinolonas y se necesitan otros mecanismos (mutaciones *gyrA*, *gyrB* o *parA*) para llegar a niveles de resistencia importantes (Nakano y cols., 1997; Everett y cols., 1996). En cambio, en el caso de *S. maltophilia* la sobreexpresión del sistema *smeDEF* produce unos niveles de resistencia de relevancia clínica a quinolonas. Esto puede deberse a diversos factores, el sistema *smeDEF* podría ser más eficaz para el transporte de quinolonas que los sistemas *mexABoprM* y *acrAB-tolC* y/o la envoltura celular de *S. maltophilia* podría ser menos permeable que las de *P. aeruginosa* y *E. coli*. De momento, con los ensayos realizados no podemos contestar a ésta pregunta aunque sería interesante profundizar en este aspecto.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo y los obtenidos por otros grupos sugieren que en condiciones "normales" de crecimiento la expresión de los sistemas de eflujo es muy baja. Sin embargo, la presencia de antibacterianos que a su vez sean sustratos del sistema de eflujo conduce a la selección de mutantes que sobreexpresan los mecanismos de multirresistencia. Tanto en *P. aeruginosa* (Ziha-Zarifi y cols., 1999; Srikumar y cols., 2000) como en *N. gonorrhoeae* (Shafer y cols., 1995; Hagman y Shafer, 1995) se han identificado diversas mutaciones responsables de la sobreexpresión de sistemas de eflujo en estas

especies. Éstas mutaciones se localizan habitualmente en el gen que codifica la síntesis de un represor transcripcional. En algunos casos, también se localizan en la región intergénica entre el operón estructural (RND, MFS y OMF) y el gen represor. El análisis de la secuencia adyacente al operón *smeDEF* nos ha permitido identificar el posible represor transcripcional del sistema (SmeT), que presenta homología con proteínas de la subfamilia TetR (Harrison y Aggarwal, 1990). La organización génica del componente regulador y los componentes estructurales se muestra en la Figura 31. Se observa que la disposición de los genes se conserva en comparación con otros sistemas caracterizados, y que al igual que en otros represores transcripcionales, el gen está orientado en sentido divergente al operón estructural. Por el contrario, el gen que codifica la síntesis del activador transcripcional NfxC del sistema *mexCDoprN* de *P. aeruginosa* (Kohler y cols., 1997), está orientado en el mismo sentido que el operón estructural. A diferencia de los demás represores representados en la Figura 32, NfxC forma parte de la subfamilia LysR que agrupa a activadores de la transcripción.

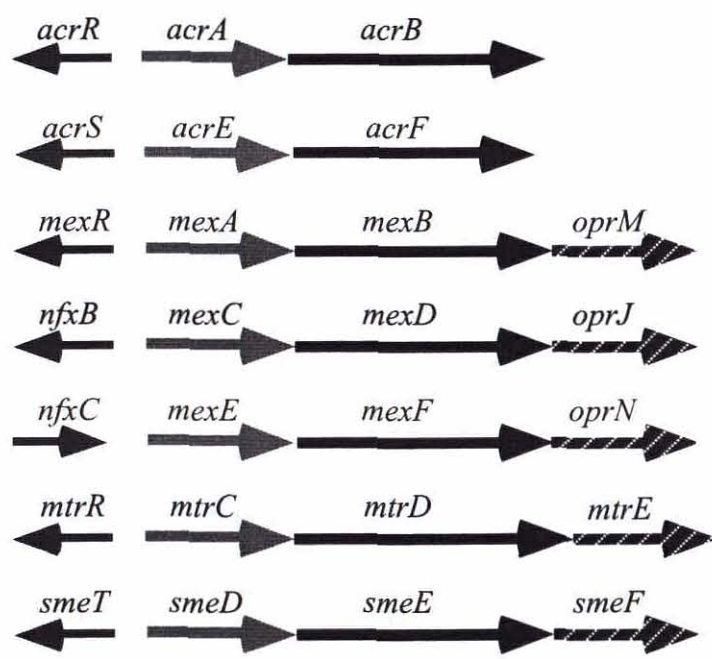


Figura 31. Organización génica de sistemas de bombeo RND caracterizados, se incluye el sistema *smeT**smeDEF* identificado en *S. maltophilia*.

Los análisis de transcripción del sistema *smeDEF* en las cepas *S. maltophilia* D457 y su derivado multirresistente D457R nos ha permitido identificar al menos 2 sistemas de

regulación. En la cepa parental *S. maltophilia* D457 los niveles de transcritos ARNm *smeDEF* son muy bajos comparados con los del derivado multirresistente D457R. El aumento de la transcripción de *smeDEF* en el mutante comparado con el parental indica que el fenotipo multirresistente se ha adquirido mediante una mutación en el mecanismo de regulación transcripcional. La comparación de parte de la zona intergénica y de la secuencia de *smeT* de *S. maltophilia* D457 y su derivado D457R ha permitido la identificación de una mutación puntual. Ésta se localiza aguas abajo del dominio HTH, en la posición 166 de región codificante de *SmeT* y conlleva a un cambio aminoacídico, leucina en la cepa parental y glutamina en el derivado multirresistente. Esto indica que esta zona es importante para la funcionalidad de *SmeT*, bien porque esté directamente implicada en el reconocimiento de ADN, bien porque la sustitución de una leucina por una glutamina puede producir un cambio conformacional que resultaría en una proteína no funcional. De hecho en los represores de transcripción de diversos sistemas de bombeo, se han descrito mutaciones puntuales, tanto en la región HTH como fuera de ésta. El análisis de la transcripción del sistema *smeDEF* en diversos aislados de *S. maltophilia* de origen clínico, indica que en los aislados con fenotipos multirresistentes la represión de la transcripción no existe. Es posible que el aumento en los niveles de transcritos se deba a mutaciones en el gen que codifica la síntesis de la proteína *SmeT*. En un futuro sería interesante la identificación de las posibles mutaciones en cada uno de estos aislados.

Además de la represión transcripcional, hemos observado otro mecanismo de regulación que es dependiente del ciclo de crecimiento de *S. maltophilia*. Tanto en *S. maltophilia* D457 como en el mutante D457R, la transcripción máxima de *smeDEF* ocurre en la fase exponencial temprana y ésta decae de forma gradual hasta llegar a niveles no detectables en la fase de crecimiento estacionario. Las señales implicadas en la inducción de los sistemas de eflujo todavía no se conocen de forma clara. El sistema *acrAB* de *E. coli* se induce por condiciones de estrés como el etanol, concentraciones elevadas de NaCl y en fase de crecimiento estacionario (Ma y cols., 1995). Sin embargo, en el caso de *smeDEF* no se detectan transcritos en fase estacionaria. La aparente redundancia de sistemas de bombeo en una misma especie con rangos de sustrato que se superponen se podría explicar por el hecho de que cada sistema tendría una función fisiológica diferente y por lo tanto una regulación distinta.

Aunque son resultados preliminares y es necesaria su comprobación, el aislado clínico *S. maltophilia* C357 es el único en el que se ha detectado el transcrito *smeD* en la fase de crecimiento estacionaria. Además, presenta los niveles de *SmeF* y de resistencia más elevados en comparación con los demás aislados clínicos. Tenemos por tanto un ejemplo en el que se ha saltado la regulación por fase de crecimiento. El posterior análisis de la secuencia de *SmeT*

y de las secuencias promotoras tanto de *smeT* como de *smeDEF* nos dará información sobre la alteración de este sistema de regulación.

Está comúnmente aceptado que la adquisición de un determinante de resistencia conduce a una reducción de la eficacia competitiva de las bacterias (Andersson y Levin, 1999). Sin embargo, hay pocos experimentos publicados que estudien esta posibilidad de un modo riguroso. A modo de ejemplo, se ha demostrado que distintos mutantes resistentes a antibióticos de *S. typhimurium* eran menos virulentos en un modelo de colonización animal (Bjorkman y cols., 1998). En el caso de los sistemas de bombeo múltiple, el hecho de su elevada inespecificidad así como su estricta regulación negativa, hace suponer que las mutaciones que conduzcan a su sobreexpresión pueden tener un importante coste biológico asociado al fenotipo de multirresistencia. De hecho, la reducción que se observa en la tasa de crecimiento y en el tamaño celular de *S. maltophilia* D457R comparada con la cepa parental D457, sugieren que la sobreexpresión de *smeDEF* supone un coste biológico. Aunque recientemente no se han realizado estudios relacionados con el *fitness* en cepas multirresistentes, ya en 1978 se observó que las mutaciones *mtr* en aislados de *N. gonorrhoeae* conducían a un aumento en el tiempo de generación (Sparling y cols., 1975). Los ensayos de competición se utilizan habitualmente para medir el coste biológico que supone un determinado genotipo o fenotipo (Andersson y Levin, 1999). En nuestro caso, el fenotipo multirresistente debido a la mutación puntual en el gen *smeT* en la cepa *S. maltophilia* D457R conlleva a su desplazamiento en cultivos mixtos con la cepa parental silvestre. Éste efecto también se observa en el cultivo puro *S. maltophilia* D457R: clones revertientes sensibles al marcador antibiótico emergen a medida que se realizan diluciones del cultivo en medio fresco. En su conjunto, estos datos indican que el fenotipo multirresistente de D457R está asociado a una alteración en el estado fisiológico y en la competencia ecológica (*fitness*) del microorganismo. Aunque no conocemos el mecanismo responsable de tal efecto, ésta alteración puede deberse a que el amplio rango de sustratos de bombas de extrusión constituye en si un problema ya que nutrientes u otros compuestos esenciales pueden ser transportados hacia el exterior celular y/o otros genes pueden estar implicados en éste fenómeno por lo que no tiene que ser un efecto directo del funcionamiento de bombas de eflujo. De hecho, hemos comprobado que la concentración de ATP (moles/ mg de proteína) es más baja en el derivado multirresistente, lo que indica que el estado energético de *S. maltophilia* D457R es inferior a la cepa silvestre D457. Dado que este bajo nivel energético puede influir en muchos procesos celulares, incluyendo cambios en el superenrollamiento del ADN (van Workum y cols., 1996), y por tanto alterar la expresión de un amplio rango de proteínas, se procedió a comparar los proteomas de *S. maltophilia* D457 y *S. maltophilia* D457R. La comparación de geles bidimensionales de extractos celulares de proteínas de ambas estirpes permitieron determinar que existían cambios relevantes, tanto en los niveles de

expresión, como en la movilidad de distintas proteínas. Esta diferencia podría deberse a un efecto inespecífico debido a los cambios energéticos detectables entre ambas cepas y/o a un efecto regulador general más específico. En este sentido, se ha descrito que el sistema MexABOprM de *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de expulsar moléculas implicadas en la señalización por *quorum sensing* en esta especie bacteriana, y que mutantes que sobreexpresan este sistema, son incapaces de regular de un modo adecuado la producción de metabolitos cuya síntesis responde a *quorum sensing* (Evans y cols., 1998). Por otro lado, sería interesante estudiar la incidencia de mutaciones compensatorias en los sistemas de bombeo. Éste tipo de mutaciones compensarían el coste biológico asociado al fenotipo de multirresistencia y explicarían porqué este tipo de mutantes multirresistentes, con una baja competencia ecológica, pueden de todos modos mantenerse en el ambiente clínico, dando lugar a la selección de aislados que sobreexpresan el sistema *smeDEF* tales como los que se han analizado en esta memoria.

La implicación de los sistemas de bombeo en diversos procesos celulares: resistencia a antimicrobianos, protección frente a compuestos (sales biliares, ácidos grasos, solventes orgánicos, etc.) habituales en el hábitat natural de la especie, contribución al mecanismo de *quorum sensing* y a la respuesta global frente a condiciones de estrés sugiere que los sistemas de bombeo forman parte de una compleja red de señales en la que otros muchos procesos son también dependientes. Por lo tanto, sería interesante conocer la naturaleza de ésta red y de que forma las señales regulan la expresión de los distintos procesos que pueden ser afectados por la expresión de *SmeDEF*. Estos estudios contribuirían, tanto a avanzar en la comprensión del papel fisiológico de los sistemas de bombeo múltiple de drogas, como en conocer de un modo más detallado el efecto de la resistencia a los antibióticos en el metabolismo bacteriano.

6. Conclusiones

1. Se ha seleccionado un mutante multirresistente de *S. maltophilia* mediante selección antibiótica. El mutante *S. maltophilia* D457R, no sólo presentaba menor susceptibilidad frente al antibiótico de selección, sino también frente a otros antibióticos no relacionados estructuralmente con el mismo.
2. Se ha clonado a partir del ADN cromosómico de *S. maltophilia* D457R, una región que contiene genes de resistencia a eritromicina y a metales pesados y que muestra valores de identidad superiores al 98% con genes de *S. aureus*. La región clonada presenta un contenido G+C del 35,1%, significativamente distinto al contenido G+C del 63-67,5% descrito para *S. maltophilia* y más parecido a los valores de 32-36% descrito para el Género *Staphylococcus*. Estos datos sugieren un posible origen Gram-positivo de los genes clonados a partir de *S. maltophilia* D457R.
3. Se ha clonado y caracterizado a partir de *S. maltophilia* D457R el sistema de bombeo *smeDEF* que codifica la síntesis de tres componentes pertenecientes a las familias MFP, RND y OMF, respectivamente. La estructura génica de *smeDEF* es semejante a la de otros sistemas de bombeo previamente caracterizados en bacterias Gram-negativas. El funcionamiento de SmeDEF es dependiente de la fuerza motriz de protones y está presente en todos los aislados de *S. maltophilia* analizados.
4. La expresión del sistema SmeDEF disminuye la sensibilidad a eritromicina, cloranfenicol, quinolonas y tetraciclina, tanto en *S. maltophilia*, como cuando se expresa en un huésped heterólogo como *E. coli*.
5. Se han identificado dos mecanismos de regulación de la expresión de *smeDEF*: 1) represión de la transcripción por un posible regulador específico y 2) regulación dependiente de la fase de crecimiento. La represión de la transcripción no está presente en el mutante multirresistente *S. maltophilia* D457R que sobreexpresa *smeDEF*, mientras que sí se observa en la cepa parental *S. maltophilia* D457. La regulación dependiente de la fase de crecimiento en la que la transcripción es máxima en fase exponencial y disminuye gradualmente hasta alcanzar niveles indetectables en fase estacionaria, se detecta tanto en la cepa parental como en el mutante multirresistente.
6. Se ha identificado el posible represor transcripcional (*smeT*) del sistema *smeDEF*. SmeT muestra homología con proteínas represoras de transcripción de la subfamilia TetR. La comparación de las secuencias *smeT* de *S. maltophilia* D457 y D457R ha permitido la

identificación de una mutación puntual en el gen *smeT* del mutante multirresistente. Esta mutación es posiblemente la responsable de desrepresión en la expresión de *smeDEF* en el mutante multirresistente.

7. La sobreexpresión de SmeDEF en aislados clínicos de *S. maltophilia* que muestran los valores de CMIs más elevados, indica que éste sistema es un mecanismo importante en la adquisición del fenotipo de multirresistencia en esta especie bacteriana.

8. El fenotipo multirresistente de *S. maltophilia* D457R está asociado a una alteración en el estado fisiológico, en la competencia ecológica (*fitness*) y en el estado energético del microorganismo comparado con la cepa parental *S. maltophilia* D457.

9. La comparación de los proteomas de *S. maltophilia* D457 y D457R ha puesto de manifiesto que existen diferencias en los niveles de expresión y cambios en la movilidad de distintas proteínas. Esto sugiere que el sistema *smeDEF* podría formar parte de una compleja red de señales en la que otros muchos procesos celulares son también dependientes.

7. Referencias Bibliográficas

- Ahmad, S., Glavas, N. A., y Bragg, P. D.** (1992) A mutation at Gly314 of the beta subunit of the *Escherichia coli* pyridine nucleotide transhydrogenase abolishes activity and affects the NADP(H)-induced conformational change. *Eur J Biochem* 207: 733-739.
- Alekshun, M. N., y Levy, S. B.** (1997) Regulation of chromosomally mediated multiple antibiotic resistance: the mar regulon. *Antimicrob Agents Chemother*: 2067-2075.
- Alfonso, A., Grundahl, K., Duerr, J. S., Han, H. P., y Rand, J. B.** (1993) The *Caenorhabditis elegans* unc-17 gene: a putative vesicular acetylcholine transporter. *Science* 261: 617-619.
- Alonso, A., Campanario, E., y Martínez, J. L.** (1999) Emergence of multidrug-resistant mutants is increased under antibiotic selective pressure in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 145: 2857-2862.
- Alonso, A., Rojo, F., y Martínez, J. L.** (1999) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ Microb* 1(5): 42-430.
- Alwine, J. C., Kemp, D. J., y Stark, G. R.** (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5350-5354.
- Andersson, D. I., y Levin, B. R.** (1999) The biological cost of antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2: 489-493.
- Aono, R., Kobayashi, M., Nakajima, H., y Kobayashi, H.** (1995) A close correlation between improvement of organic solvent tolerance levels and alteration of resistance toward low levels of multiple antibiotics in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem* 59: 213-218.
- Arpi, M., Victor, M. A., Mortensen, I., Gottschau, A., y Bruun, B.** (1996) In vitro susceptibility of 124 *Xanthomonas maltophilia* (*Stenotrophomonas maltophilia*) isolates: comparison of the agar dilution method with the E-test and two agar diffusion methods. *APMIS* 104: 108-114.
- Asako, H., Nakajima, H., Kobayashi, K., Kobayashi, M., y Aono, R.** (1997) Organic solvent tolerance and antibiotic resistance increased by overexpression of marA in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 63: 1428-1433.
- Atlas, R. M.** (1993) Handbook of microbiological media. London: CRC Press, Inc.

Baev, N., Endre, G., Petrovics, G., Banfalvi, Z., y Kondorosi, A. (1991) Six nodulation genes of nod box locus 4 in *Rhizobium meliloti* are involved in nodulation signal production: nodM codes for D-glucosamine synthetase. *Mol Gen Genet* 228: 113-124.

Bagdasarian, M., y Bagdasarian, M. M. (1994) Gene cloning and expression. *Methods for general and molecular bacteriology* 406-417.

Benz, R., y Bauer, K. (1988) Permeation of hydrophilic molecules through the outer membrane of gram-negative bacteria. Review on bacterial porins. *Eur J Biochem* 176: 1-19.

Berg, G., Roskot, N., y Smalla, K. (1999) Genotypic y phenotypic relationships between clinical and environmental isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *J Clin Microbiol* 37: 3594-3600.

Berg, R. D. (1996) The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 4: 430-435.

Bergogne Berezin, E., Decre, D., y Joly Guillou, M. L. (1993) Opportunistic nosocomial multiply resistant bacterial infections--their treatment and prevention. *J Antimicrob Chemother* 32 Suppl A: 39-47.

Bjorkman, J., Hughes, D., y Andersson, D. I. (1998) Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 3949-3953.

Bjorkman, J., Samuelsson, P., Andersson, D. I., y Hughes, D. (1999) Novel ribosomal mutations affecting translational accuracy, antibiotic resistance and virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* 31: 53-58.

Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H., y Hacker, J. (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* 62: 606-614.

Bottger, E. C., Springer, B., Pletschette, M., y Sander, P. (1998) Fitness of antibiotic-resistant microorganisms and compensatory mutations. *Nature Medicine* 4: 1343-1344.

Brosius, J., y Gould, S. J. (1992) On nomenclature: a comprehensive (and respectful) taxonomy for pseudogenes and other "junk DNA". *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 10706-10710.

Brow, M. A., Pesin, R., y Sutcliffe, J. G. (1985) The tetracycline repressor of pSC101. *Mol Biol Evol* 2: 1-12.

Buchrieser, C., Prentice, M., y Carniel, E. (1998) The 102-kilobase unstable region of *Yersinia pestis* comprises a high-pathogenicity island linked to a pigmentation segment which undergoes

internal rearrangement. J Bacteriol 180: 2321-2329.

Burns, J. L., Hedin, L. A., y Lien, D. M. (1989) Chloramphenicol resistance in *Pseudomonas cepacia* because of decreased permeability. Antimicrob Agents Chemother 33: 136-141.

Bush, K., Jacoby, G. A., y Medeiros, A. A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 39: 1211-1233.

Chambers, H. F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev 10: 781-791.

Chapman, J. S., y Georgopapadakou, N. H. (1989) Fluorometric assay for fleroxacin uptake by bacterial cells. Antimicrob Agents Chemother 33: 27-29.

Cohen, S. P., McMurry, L. M., Hooper, D. C., Wolfson, J. S., y Levy, S. B. (1989) Cross-resistance to fluoroquinolones in multiple-antibiotic-resistant (Mar) *Escherichia coli* selected by tetracycline or chloramphenicol: decreased drug accumulation associated with membrane changes in addition to OmpF reduction. Antimicrob Agents Chemother 33: 1318-1325.

Courvalin, P. (1994) Transfer of antibiotic resistance genes between gram-positive and gram-negative bacteria. Antimicrob Agents Chemother 38: 1447-1451.

Cundliffe, E. (1992) Self-protection mechanisms in antibiotic producers. Ciba Found Symp 171: 199-208; discussion 208-14.

Davies, J. (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. Science 264: 375-382.

Davies, J., y Wright, G. D. (1997) Bacterial resistance to aminoglycoside antibiotics. Trends Microbiol 5: 234-240.

Davies, J. E. (1997) Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. Ciba Found Symp 207: 15-27.

de Lorenzo, V., y Perez-Martin, J. (1996) Regulatory noise in prokaryotic promoters: how bacteria learn to respond to novel environmental signals. Mol Microbiol 19: 1177-1184.

de Lorenzo, V., y Timmis, K. N. (1994) Analysis and Construction of Stable Phenotypes in Gram-Negative Bacteria with Tn5- and Tn10-Derived Minitransposons. Methods Enzymol 235: 386-405.

de Lorenzo, V., Herrero, M., Jakubzik, U. y Timmis K.N. (1990) Mini-Tn5 Transposon Derivates for Insertion Mutagenesis, Promoter Probing, and Chromosomal Insertion of Cloned DNA in Gram-Negative Bacteria. *J Bacteriol* 172: 6568-6572.

Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J. E., Gleeson, C., Holden, D. W., y Hensel, M. (1998) Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol* 180: 4775-4780.

Denton, M., Todd, N. J., Kerr, K. G., Hawkey, P. M., y Littlewood, J. M. (1998) Molecular epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from clinical specimens from patients with cystic fibrosis and associated environmental samples. *J Clin Microbiol* 36: 1953-1958.

Denton, M., y Kerr, K. G. (1998) Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. *Clin Microbiol Rev* 11: 57.

Dinh, T., Paulsen, I. T., y Saier, M. H. J. (1994) A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. *J Bacteriol* 176: 3825-3831.

Donachie, W. D., Begg, K. J., y Vicente, M. (1976) Cell length, cell growth and cell division. *Nature* 264: 328-333.

Drancourt, M., Bollet, C., y Raoult, D. (1997) *Stenotrophomonas africana* sp. nov., an opportunistic human pathogen in Africa. *Int J Sys Bacteriol* 47: 160-163.

Duong, F., Lazdunski, A., Cami, B., y Murgier, M. (1992) Sequence of a cluster of genes controlling synthesis and secretion of alkaline protease in *Pseudomonas aeruginosa*: relationships to other secretory pathways. *Gene* 121: 47-54.

Eisenstein, B. I., y Sparling, P. F. (1978) Mutations to increased antibiotic sensitivity in naturally-occurring gonococci. *Nature* 271: 242-244.

Evans, K., Passador, L., Srikumar, R., Tsang, E., Nezezón, J., y Poole, K. (1998) Influence of the MexAB-OprM multidrug efflux system on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 180: 5443-5447.

Everett, M. J., Jin, Y. F., Ricci, V., y Piddock, L. J. V. (1996) Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2380-2386.

- Fath, M. J., y Kolter, R.** (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57: 995-1017.
- Fernandez Moreno, M. A., Vallin, C., y Malpartida, F.** (1997) Streptothricin biosynthesis is catalyzed by enzymes related to nonribosomal peptide bond formation. *J Bacteriol* 179: 6929-6936.
- Fernandez-Moreno, M. A., Caballero, J. L., Hopwood, D. A., y Malpartida, F.** (1991) The act cluster contains regulatory and antibiotic export genes, direct targets for translational control by the bldA tRNA gene of *Streptomyces*. *Cell* 66: 769-780.
- Finlay, B. B.** (1999) Bacterial disease in diverse hosts. *Cell* 96: 315-318.
- Finlay, B. B., y Falkow, S.** (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 136-169.
- Foght, J. M., Westlake, D. W., Johnson, W. M., y Ridgway, H. F.** (1996) Environmental gasoline-utilizing isolates and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* are taxonomically indistinguishable by chemotaxonomic and molecular techniques. *Microbiology* 142: (Pt 9):2333-40.
- Fralick, J. A.** (1996) Evidence that TolC is required for functioning of the Mar/AcrAB efflux pump of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 178: 5803-5805.
- Fukuda, H., Hosaka, M., Iyobe, S., Gotoh, N., Nishino, T., y Hirai, K.** (1995) nfxC-type quinolone resistance in a clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 790-792.
- Fukuoka, T., Masuda, N., Takenouchi, T., Sekine, N., Iijima, M., y Ohya, S.** (1991) Increase in susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to carbapenem antibiotics in low-amino-acid media. *Antimicrob Agents Chemother* 35: 529-532.
- Fuqua, C., Winans, S. C., y Greenberg, E. P.** (1996) Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* 50: 727-751.
- Garrison, M. W., Anderson, D. E., Campbell, D. M., Carroll, K. C., Malone, C. L., Anderson, J. D., Hollis, R. J., y Pfaller, M. A.** (1996) *Stenotrophomonas maltophilia*: Emergence of multidrug-resistant strains during therapy and in an in vitro pharmacodynamic chamber model. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2859-2864.
- George, A. M.** (1996) Multidrug resistance in enteric and other Gram-negative bacteria. *FEMS*

Microbiology Letters 139: 1-10.

Glaser, P., Sakamoto, H., Bellalou, J., Ullmann, A., y Danchin, A. (1988) Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase- haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. EMBO J 7: 3997-4004.

Goldberg, R. B., Benber, R. A., y Steicher, S. L. (1974) Direct selection for P1-sensitive mutants of enteric bacteria. J Bacteriol 118: 810-814.

Gorg, A., Boguth, G., Obermaier, C., Posch, A., y Weiss, W. (1995) Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis with immobilized pH gradients in the first dimension (IPG-Dalt): the state of the art and the controversy of vertical versus horizontal systems. Electrophoresis 16: 1079-1086.

Gotoh, N., Tsujimoto, H., Poole, K., Yamagishi, J., y Nishino, T. (1995) The outer membrane protein OprM of *Pseudomonas aeruginosa* is encoded by oprK of the mexA-mexB-oprK multidrug resistance operon. Antimicrob. Agents Chemother. 39: 2567-2569.

Gottesman, M. M., y Pastan, I. (1993) Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. Annu Rev Biochem 62: 385-427.

Gould, G. W., y Bell, G. I. (1990) Facilitative glucose transporters: an expanding family. Trends Biochem Sci 15: 18-23.

Govan, J. R., y Deretic, V. (1996) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and Burkholderia cepacia. Microbiol Rev 60: 539-574.

Guerrero, A., Cobo, J., Fortun, J., Navas, E., Quereda, C., Asensio, A., Canon, J., Blazquez, J., y Gomez-Mampaso, E. (1997) Nosocomial transmission of Mycobacterium bovis resistant to 11 drugs in people with advanced HIV-1 infection. Lancet 350: 1738-1742.

Hagman, K. E., Pan, W., Spratt, B. G., Balthazar, J. T., Judd, R. C., y Shafer, W. M. (1995) Resistance of Neisseria gonorrhoeae to antimicrobial hydrophobic agents is modulated by the mtrRCDE efflux system. Microbiology 141: 611-622.

Hagman, K. E., y Shafer, W. M. (1995) Transcriptional control of the mtr efflux system of Neisseria gonorrhoeae. J Bacteriol 177: 4162-4165.

Hancock, R. E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. Clin Infect Dis 27: Suppl 1:S93-9.

Harrison, S. C., y Aggarwal, A. K. (1990) DNA recognition by proteins with the helix-turn-helix motif. *Annu Rev Biochem* 59: 933-969.

Hayashi, S., y Wu, H. C. (1990) Lipoproteins in bacteria. *J Bioenerg Biomembr* 22: 451-471.

Heir, E., Sundheim, G., y Holck, A. L. (1995) Resistance to quaternary ammonium compounds in *Staphylococcus* spp. isolated from the food industry and nucleotide sequence of the resistance plasmid pST827. *J Appl Bacteriol* 79: 149-156.

Hernandez, A., Mellado, R. P., y Martinez, J. L. (1998) Metal accumulation and vanadium-induced multidrug resistance by environmental isolates of *Escherichia hermannii* and *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 64: 4317-4320.

Higgins, C. F., y Gottesman, M. M. (1992) Is the multidrug transporter a flippase? *Trends Biochem Sci* 17: 18-21.

Hiramatsu, K. (1998) The emergence of *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin in Japan. *Am J Med* 104: 7S-10S.

Hosaka, M., Gotoh, N., y Nishino, T. (1995) Purification of a 54-kilodalton protein (OprJ) produced in NfxB mutants of *Pseudomonas aeruginosa* and production of a monoclonal antibody specific to OprJ. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1731-1735.

Hugh, R., y Leifson, E. (1963) A description of the type strain of *Pseudomonas maltophilia*. *Int Bull Bacteriol Nomencl Taxon* 13: 133-138.

Jaffe, A., Chabbert, Y. A., y Derlot, E. (1983) Selection and characterization of beta-lactam-resistant *Escherichia coli* K-12 mutants. *Antimicrob Agents Chemother* 23: 622-625.

Jakobi, M., Winkelmann, G., Kaiser, D., Kempter, C., Jung, G., Berg, G., y Bahl, H. (1996) Maltophilin: A new antifungal compound produced by *Stenotrophomonas maltophilia* R3089. *J Antibiot* 49: 1101-1104.

Johnson, J. M., y Church, G. M. (1999) Alignment and structure prediction of divergent protein families: periplasmic and outer membrane proteins of bacterial efflux pumps. *J Mol Biol* 287: 695-715.

Juhnke, M. E., y des Jardin, E. (1989) Selective medium for isolation of *Xanthomonas maltophilia* from soil and rhizosphere environments. *Appl Environ Microbiol* 55: 747-750.

Kaback, H. R., Bibi, E., y Roepe, P. D. (1990) Beta-galactoside transport in *E. coli*: a functional

dissection of lac permease. Trends Biochem Sci 15: 309-314.

Karaolis, D. K., Johnson, J. A., Bailey, C. C., Boedeker, E. C., Kaper, J. B., y Reeves, P. R. (1998) A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. Proc Natl Acad Sci U S A 95: 3134-3139.

Kerr, J. R. (1996) Inhibition of growth of fungi pathogenic to man by *Stenotrophomonas maltophilia*. J Med Microbiol 45: 380-382.

Kieboom, J., Dennis, J. J., deBont, J. A. M., y Zylstra, G. J. (1998) Identification and molecular characterization of an efflux pump involved in *Pseudomonas putida* S12 solvent tolerance. J Biol Chem 273: 85-91.

King, B. A., Shannon, K. P., y Phillips, I. (1978) Aminoglycoside 6'-N acetyltransferase production by an isolate of *Pseudomonas maltophilia* [letter]. J Antimicrob Chemother 4: 467-468.

Klein, J. R., Henrich, B., y Plapp, R. (1991) Molecular analysis and nucleotide sequence of the envCD operon of *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 230: 230-240.

Kohler, T., MicheaHamzehpour, M., Henze, U., Gotoh, N., Curty, L. K., y Pechere, J. C. (1997) Characterization of MexE-MexF-OprN, a positively regulated multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa*. Mol Microbiol 23: 345-354.

Kohler, T., MicheaHamzehpour, M., Plesiat, P., Kahr, A. L., y Pechere, J. C. (1997) Differential selection of multidrug efflux systems by quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 41: 2540-2543.

Koronakis, V., Li, J., Koronakis, E., y Stauffer, K. (1997) Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. Mol Microbiol 23: 617-626.

Krieg, N. R. (1984) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Baltimore: Williams & Wilkins.

Kyte, J., y Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132.

Laing, F. P., Ramotar, K., Read, R. R., Alfieri, N., Kureishi, A., Henderson, E. A., y Louie, T. J. (1995) Molecular epidemiology of *Xanthomonas maltophilia* colonization and infection in the hospital environment. J Clin Microbiol 33: 513-518.

Lambert, T., Ploy, M. C., Denis, F., y Courvalin, P. (1999) Characterization of the chromosomal

aac(6')-Iz gene of *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 43: 2366-2371.

Lecso-Bornet, M., Pierre, J., Sarkis-Karam, D., Lubera, S., y Bergogne-Berezin, E. (1992) Susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to six quinolones and study of outer membrane proteins in resistant mutants selected in vitro. Antimicrob Agents Chemother 36: 669-671.

Lessing, M. P., y Raftery, M. J. (1998) Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*. Lancet 351: 601-602.

Letoffe, S., Delepelaire, P., y Wandersman, C. (1990) Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*: the specific secretion functions are analogous to those of *Escherichia coli* alpha-haemolysin. EMBO J 9: 1375-1382.

Li, X. Z., Zhang, L., y Poole, K. (1998) Role of the multidrug efflux systems of *Pseudomonas aeruginosa* in organic solvent tolerance. J Bacteriol 180: 2987-2991.

Li, X. Z., Livermore, D. M., y Nikaido, H. (1994) Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin. Antimicrob Agents Chemother 38: 1732-1741.

Li, X. Z., Nikaido, H., y Poole, K. (1995) Role of mexA-mexB-oprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother 39: 1948-1953.

Liesegang, H., Lemke, K., Siddiqui, R. A., y Schlegel, H. G. (1993) Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. J Bacteriol 175: 767-778.

Liu, Y., Peter, D., Roghani, A., Schuldiner, S., Prive, G. G., Eisenberg, D., Brecha, N., y Edwards, R. H. (1992) A cDNA that suppresses MPP⁺ toxicity encodes a vesicular amine transporter. Cell 70: 539-551.

Lomovskaya, O. y Lewis, K. (1992) *Emr*, an *Escherichia coli* locus for multidrug resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 89: 8938-8942.

Lucas, C. E., Balthazar, J. T., Hagman, K. E., y Shafer, W. M. (1997) The MtrR repressor binds the DNA sequence between the *mtrR* and *mtrC* genes of *Neisseria gonorrhoeae*. J Bacteriol 179: 4123-4128.

Lundin, A., Hasenson, M., Persson, J., y Pousette, A. (1986) Estimation of biomass in growing cell lines by adenosine triphosphate assay. Methods Enzymol 133: 27-42.

- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., y Hearst, J. E.** (1993) Molecular cloning and characterization of *acrA* and *acrE* genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175: 6299-6313.
- Ma, D., Cook, D. N., Hearst, J. E., y Nikaido, H.** (1994) Efflux pumps and drug resistance in gram-negative bacteria. *Trends Microbiol* 2: 489-493.
- Ma, D., Cook, D. N., Alberti, M., Pon, N. G., Nikaido, H., y Hearst, J. E.** (1995) Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 16: 45-55.
- Ma, D., Alberti, M., Lynch, C., Nikaido, H., y Hearst, J. E.** (1996) The local repressor *AcrR* plays a modulating role in the regulation of *acrAB* genes of *Escherichia coli* by global stress signals. *Mol Microbiol* 19: 101-112.
- Maes, M.** (1993) Fast classification of plant-associated bacteria in the *Xanthomonas* genus. *FEMS Microbiol Lett* 113: 161-166.
- Maiden, M. C. J.** (1998) Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clin Infect Dis* 27: S12-S20.
- Marger, M. D., y Saier, M. H. J.** (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends Biochem Sci* 18: 13-20.
- Martinez Martinez, L., Pascual, A., Conejo, M. C., Picabea, L., y Perea, E. J.** (1999) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to imipenem induced by eluates from siliconized latex urinary catheters is related to outer membrane protein alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 397-399.
- Masuda, N., y Ohya, S.** (1992) Cross-resistance to meropenem, cepheems, and quinolones in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1847-1851.
- Masuda, N., Sakagawa, E., y Ohya, S.** (1995) Outer membrane proteins responsible for multiple drug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 645-649.
- Masuda, N., Gotoh, N., Ohya, S., y Nishino, T.** (1996) Quantitative correlation between susceptibility and *OprJ* production in *NfxB* mutants of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 909-913.
- Matsuoka, M., Endou, K., Kobayashi, H., Inoue, M., y Nakajima, Y.** (1998) A plasmid that encodes three genes for resistance to macrolide antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol Lett* 167: 221-227.

McCormick, J. B. (1998) Epidemiology of emerging/re-emerging antimicrobial-resistant bacterial pathogens. *Curr Opin Microbiol* 1: 125-129.

Miller, J. F. (1994) Bacterial transformation by electroporation. *Methods Enzymol* 235: 375-385.

Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T., y Tsuchiya, T. (1999) Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 415-417.

Moken, M. C., McMurry, L. M., y Levy, S. B. (1997) Selection of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli* by using the disinfectant pine oil: Roles of the mar and acrAB loci. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2770-2772.

Moore, R. A., y Hancock, R. E. W. (1986) Involvement of outer membrane of *Pseudomonas cepacia* in aminoglycoside and polymyxin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 30: 923-926.

Morimyo, M., Hongo, E., Hama-Inaba, H., y Machida, I. (1992) Cloning and characterization of the mvrC gene of *Escherichia coli* K-12 which confers resistance against methyl viologen toxicity. *Nucleic Acids Res* 20: 3159-3165.

Muder, R. R., Harris, A. P., Muller, S., Edmond, M., Chow, J. W., Papadakis, K., Wagener, M. W., Bodey, G. P., y Steckelberg, J. M. (1996) Bacteremia due to *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a prospective, multicenter study of 91 episodes. *Clin Infect Dis* 22: 508-512.

Nakamura, H. (1968) Genetic determination of resistance to acriflavin, phenyl alcohol, and sodium dodecyl sulphate in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 96: 987-996.

Nakano, M., Deguchi, T., Kawamura, T., Yasuda, M., Kimura, M., Okano, Y., y Kawada, Y. (1997) Mutations in the gyrA and parC genes in fluoroquinolone-resistant clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 2289-2291.

National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997) Approved standard M7-A4. Dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. PA, USA: Wayne.

Nayler, J. H. (1987) Resistance to beta-lactams in gram-negative bacteria: relative contributions of beta-lactamase and permeability limitations. *J Antimicrob Chemother* 19: 713-732.

Neyfakh, A. A., Bidnenko, V. E., y Chen, L. B. (1991) Efflux-mediated multidrug resistance in *Bacillus subtilis*: Similarities and dissimilarities with the mammalian system. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

88: 4781-4785.

Neyfakh, A. A., Borsch, C. M. y Kaatz, G. W. (1993) Fluoroquinolone Resistance Protein NorA of *Staphylococcus aureus* Is a Multidrug Efflux Transporter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 37: 128-129.

Nies, D. H., Nies, A., Chu, L., y Silver, S. (1989) Expression and nucleotide sequence of a plasmid-determined divalent cation efflux system from *Alcaligenes eutrophus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 7351-7355.

Nikaido, H., y Vaara, M. (1985) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev* 49: 1-32.

Nikaido, H. (1994) Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science* 264: 382-388.

Nikaido, H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 33: 285-291.

Nikaido, H. (1998) Multiple antibiotic resistance and efflux. *Current Opinion in Microbiology* 1: 516-523.

Noguchi, N., Emura, A., Matsuyama, H., O'Hara, K., Sasatsu, M., y Kono, M. (1995) Nucleotide sequence and characterization of erythromycin resistance determinant that encodes macrolide 2'-phosphotransferase I in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2359-2363.

Noguchi, N., Katayama, J., y O'Hara, K. (1996) Cloning and nucleotide sequence of the mphB gene for macrolide 2'-phosphotransferase II in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 144: 197-202.

Nucifora, G., Chu, L., Misra, T. K., y Silver, S. (1989) Cadmium resistance from *Staphylococcus aureus* plasmid pI258 cadA gene results from a cadmium-efflux ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 3544-3548.

Okazaki, T., y Hirai, K. (1992) Cloning and nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* nfxB gene, conferring resistance to new quinolones. *FEMS Microbiol Lett* 76: 197-202.

Okusu, H., Ma, D., y Nikaido, H. (1996) AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* 178: 306-308.

Onaka, H., Nakagawa, T., y Horinouchi, S. (1998) Involvement of two A-factor receptor homologues in *Streptomyces coelicolor* A3(2) in the regulation of secondary metabolism and morphogenesis. *Mol Microbiol* 28: 743-753.

Oshima, T., Aiba, H., Baba, T., Fujita, K., Hayashi, K., Honjo, A., Ikemoto, K., Inada, T., Itoh, T., Kajihara, M., Kanai, K., Kashimoto, K., Kimura, S., Kitagawa, M., Makino, K., Masuda, S., Miki, T., Mizobuchi, K., Mori, H., Motomura, K., Nakamura, Y., Nashimoto, H., Nishio, Y., Saito, N., y Horiuchi, T., (1996) A 718-kb DNA sequence of the *Escherichia coli* K-12 genome corresponding to the 12.7-28.0 min region on the linkage map. *DNA Res* 3: 137-155.

Palleroni, N. J., Kunisawa, R., Contopolou, R., y Doudoroffu (1973) Nucleic acid homologies in the genus *Pseudomonas*. *Int J Syst Bacteriol* 23: 333-339.

Palleroni, N. J., y Bradbury, J. F. (1993) *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. *Int J Syst Bacteriol* 43: 606-609.

Palumbo, J. D., Kado, C. I., y Phillips, D. A. (1998) An isoflavonoid-inducible efflux pump in *Agrobacterium tumefaciens* is involved in competitive colonization of roots. *J Bacteriol* 180: 3107-3113.

Pan, W., y Spratt, B. G. (1994) Regulation of the permeability of the gonococcal cell envelope by the mtr system. *Mol Microbiol* 11: 769-775.

Paton, R., Miles, R. S., y Amyes, S. G. (1994) Biochemical properties of inducible beta-lactamases produced from *Xanthomonas maltophilia*. *Antimicrob Agents Chemother* 38: 2143-2149.

Paulsen, I. T., Brown, M. H., y Skurray, R. A. (1996) Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol Rev* 60: 575-608.

Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier, M. H. J., Turner, R. J., Weiner, J. H., Goldberg, E. B., y Grinius, L. L. (1996) The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs. *Mol Microbiol* 19: 1167-1175.

Paulsen, I. T., Park, J. H., Choi, P. S., y Saier, M. H. J. (1997) A family of gram-negative bacterial outer membrane factors that function in the export of proteins, carbohydrates, drugs and heavy metals from gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett* 156: 1-8.

Paulsen, I. T., Brown, M. H., y Skurray, R. A. (1998) Characterization of the earliest known *Staphylococcus aureus* plasmid encoding a multidrug efflux system. *J Bacteriol* 180: 3477-3479.

- Penzak, S. R., y Abate, B. J.** (1997) *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*: a multidrug-resistant nosocomial pathogen. *Pharmacotherapy* 17: 293-301.
- Petrosino, J., Cantu, C. r., y Palzkill, T.** (1998) beta-Lactamases: protein evolution in real time. *Trends Microbiol* 6: 323-327.
- Pimenta, A. L., Young, J., Holland, I. B., y Blight, M. A.** (1999) Antibody analysis of the localisation, expression and stability of HlyD, the MFP component of the *E. coli* haemolysin translocator. *Mol Gen Genet* 261: 122-132.
- Poole, K., Gotoh, N., Tsujimoto, H., Zhao, Q. X., Wada, A., Yamasaki, T., Neshat, S., Yamagishi, J. I., Li, X. Z., y Nishino, T.** (1996) Overexpression of the *mexC-mexD-oprJ* efflux operon in *nfxB*-type multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 21: 713-724.
- Poole, K., Tetro, K., Zhao, Q. X., Neshat, S., Heinrichs, D. E., y Bianco, N.** (1996) Expression of the multidrug resistance operon *mexA-mexB-oprM* in *Pseudomonas aeruginosa*: *mexR* encodes a regulator of operon expression. *Antimicrob Agents Chemother* 40: 2021-2028.
- Prieto, M. A., Buhler, B., Jung, K., Witholt, B., y Kessler, B.** (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GP01 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. *J Bacteriol* 181: 858-868.
- Quinn, J. P.** (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting gram-negative pathogens. *Clin Infect Dis* 27: S117-S124.
- Ramos, J. L., Duque, E., Godoy, P., y Segura, A.** (1998) Efflux pumps involved in toluene tolerance in *Pseudomonas putida* DOT-T1E. *J Bacteriol* 180: 3323-3329.
- Reguera, J. A., Baquero, F., Perez-Diaz, J. C., y Martinez, J. L.** (1991) Factors determining resistance to beta-lactam combined with beta- lactamase inhibitors in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 27: 569-575.
- Rella, M., y Haas, D.** (1982) Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* PAO to nalidixic acid and low levels of beta-lactam antibiotics: mapping of chromosomal genes. *Antimicrob Agents Chemother* 22: 242-249.
- Renart, J., Behrens, M. M., Fernández-Renart, M., y Martinez, J. L.** (1996) Immunoblotting techniques. *Immunoassay* 537-554.

Romling, U., Wingender, J., Muller, H., y Tummeler, B. (1994) A major *Pseudomonas aeruginosa* clone common to patients and aquatic habitats. *Appl Environ Microbiol* 60: 1734-1738.

Rouch, D. A., y Skurray, R. A. (1989) IS257 from *Staphylococcus aureus*: member of an insertion sequence superfamily prevalent among gram-positive and gram-negative bacteria. *Gene* 76: 195-205.

Rouch, D. A., Cram, D. S., DiBerardino, D., Littlejohn, T. G., y Skurray, R. A. (1990) Efflux-mediated antiseptic resistance gene *qacA* from *Staphylococcus aureus*: common ancestry with tetracycline- and sugar-transport proteins. *Mol Microbiol* 4: 2051-2062.

Rowland, S. J., y Dyke, K. G. (1989) Characterization of the staphylococcal beta-lactamase transposon Tn552. *EMBO J* 8: 2761-2773.

Saier, M. H. J., Tam, R., Reizer, A., y Reizer, J. (1994) Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol Microbiol* 11: 841-847.

Saier, M. H. J., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., y Nikaido, H. (1998) Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J* 12: 265-274.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., y Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

Saito, K., Yoneyama, H., y Nakae, T. (1999) *nalB*-type mutations causing the overexpression of the MexAB-OprM efflux pump are located in the *mexR* gene of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosome. *Fems Microbiol Lett* 179: 67-72.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S., y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with the chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.

Schmidt, T., y Schlegel, H. G. (1994) Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the *ncc* locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. *J Bacteriol* 176: 7045-7054.

Schollmeier, K., y Hillen, W. (1984) Transposon Tn10 contains two structural genes with opposite polarity between *tetA* and IS10R. *J Bacteriol* 160: 499-503.

Segura, A., Duque, E., Mosqueda, G., Ramos, J. L., y Junker, F. (1999) Multiple responses of Gram-negative bacteria to organic solvents. *Environmental Microbiology* 1: 191-198.

Seoane, A. S., y Levy, S. B. (1995) Characterization of MarR, the repressor of the multiple antibiotic resistance (mar) operon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 177: 3414-3419.

Shafer, W. M., Balthazar, J. T., Hagman, K. E., y Morse, S. A. (1995) Missense mutations that alter the DNA-binding domain of the MtrR protein occur frequently in rectal isolates of *Neisseria gonorrhoeae* that are resistant to faecal lipids. *Microbiology* 141: 907-911.

Shao, Z. Q., Seffens, W., Mulbry, W., y Behki, R. M. (1995) Cloning and expression of the s-triazine hydrolase gene (trzA) from *Rhodococcus corallinus* and development of *Rhodococcus* recombinant strains capable of dealkylating and dechlorinating the herbicide atrazine. *J Bacteriol* 177: 5748-5755.

Shaw, K. J., Rather, P. N., Hare, R. S., y Miller, G. H. (1993) Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev* 57: 138-163.

Sherman, D. R., Mdluli, K., Hickey, M. J., Arain, T. M., Morris, S. L., Barry, C. E. r., y Stover, C. K. (1996) Compensatory *ahpC* gene expression in isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis*. *Science* 272: 1641-1643.

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., y Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 68: 850-858.

Smit, W. J., Boquest, A. L., Geddes, J. E., y Tosolini, F. A. (1994) The antibiotic susceptibilities of *Xanthomonas maltophilia* and their relation to clinical management. *Pathology* 26: 321-324.

Sofia, H. J., Burland, V., Daniels, D. L., Plunkett, G. R., y Blattner, F. R. (1994) Analysis of the *Escherichia coli* genome. V. DNA sequence of the region from 76.0 to 81.5 minutes. *Nucleic Acids Res* 22: 2576-2586.

Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-517.

Sparling, P. F., Sarubbi, F. A. J., y Blackman, E. (1975) Inheritance of low-level resistance to penicillin, tetracycline, and chloramphenicol in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol* 124: 740-749.

Srikumar, R., Paul, C. J., y Poole, K. (2000) Influence of mutations in the *mexR* repressor gene

on expression of the MexA-MexB-oprM multidrug efflux system of *Pseudomonas aeruginosa* [In Process Citation]. J Bacteriol 182: 1410-1414.

Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, N., y Napoli, C. (1987) Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea*. J Bacteriol 169: 5789-5794.

Swartz, M. N. (1994) Hospital-acquired infections: diseases with increasingly limited therapies. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 2420-2427.

Swings, J. P., De Vos, M., Van de Mooter, M., y De Ley, J. (1983) Transfer of *Pseudomonas maltophilia* Hugh 1981 to the genus *Xanthomonas* as *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1981) comb. nov. Int J Sys Bacteriol 33: 409-413.

Takiff, H. E., Cimino, M., Musso, M. C., Weisbrod, T., Martinez, R., Delgado, M. B., Salazar, L., Bloom, B. R., y Jacobs, W. R. J. (1996) Efflux pump of the proton antiporter family confers low-level fluoroquinolone resistance in *Mycobacterium smegmatis*. Proc Natl Acad Sci U S A 93: 362-366.

Thanassi, D. G., Cheng, L. W., y Nikaido, H. (1997) Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J Bacteriol 179: 2512-2518.

Trias, J., y Benz, R. (1993) Characterization of the channel formed by the mycobacterial porin in lipid bilayer membranes. Demonstration of voltage gating and of negative point charges at the channel mouth. J Biol Chem 268: 6234-6240.

Ullah, J. H., Walsh, T. R., Taylor, I. A., Emery, D. C., Verma, C. S., Gamblin, S. J., y Spencer, J. (1998) The crystal structure of the L1 metallo-beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia* at 1.7 angstrom resolution. J Mol Biol 284: 125-136.

van Alphen, L., Jansen, H. M., y Dankert, J. (1995) Virulence factors in the colonization and persistence of bacteria in the airways. Am J Respir Crit Care Med 151: 2094-9.

van Veen, H. W., Callaghan, R., Soceneantu, L., Sardini, A., Konings, W. N., y Higgins, C. F. (1998) A bacterial antibiotic-resistance gene that complements the human multidrug-resistance P-glycoprotein gene. Nature 391: 291-295.

van Workum, M., van Dooren, S. J., Oldenburg, N., Molenaar, D., Jensen, P. R., Snoep, J. L., y Westerhoff, H. V. (1996) DNA supercoiling depends on the phosphorylation potential in *Escherichia coli*. Mol Microbiol 20: 351-360.

Vanhoof, R., Sonck, P., y Hannecart Pokorni, E. (1995) The role of lipopolysaccharide anionic binding sites in aminoglycoside uptake in *Stenotrophomonas (Xanthomonas) maltophilia*. J Antimicrob Chemother 35: 167-171.

vanVeen, H. W., y Konings, W. N. (1998) The ABC family of multidrug transporters in microorganisms. Bba Bioenergetics 1365: 31-36.

Vartivarian, S., Anaissie, E., Bodey, G., Sprigg, H., y Rolston, K. (1994) A changing pattern of susceptibility of *Xanthomonas maltophilia* to antimicrobial agents: implications for therapy. Antimicrob Agents Chemother 38: 624-627.

Veal, W. L., Yellen, A., Balthazar, J. T., Pan, W. B., Spratt, B. G., y Shafer, W. M. (1998) Loss-of-function mutations in the mtr efflux system of *Neisseria gonorrhoeae*. Microbiology - UK 144: 621-627.

Wagner, W., Vogel, M., y Goebel, W. (1983) Transport of hemolysin across the outer membrane of *Escherichia coli* requires two functions. J Bacteriol 154: 200-210.

Walsh, T. R., MacGowan, A. P., y Bennett, P. M. (1997) Sequence analysis and enzyme kinetics of the L2 serine beta-lactamase from *Stenotrophomonas maltophilia*. Antimicrob Agents Chemother 41: 1460-1464.

Walsh, T. R., Hall, L., Assinder, S. J., Nichols, W. W., Cartwright, S. J., MacGowan, A. P., y Bennett, P. M. (1994) Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. Biochim Biophys Acta 1218: 199-201.

Wandersman, C., y Delepelaire, P. (1990) TolC, an *Escherichia coli* outer membrane protein required for hemolysin secretion. Proc Natl Acad Sci U S A 87: 4776-4780.

Waters, S. H., Rogowsky, P., Grinsted, J., Altenbuchner, J., y Schmitt, R. (1983) The tetracycline resistance determinants of RP1 and Tn1721: nucleotide sequence analysis. Nucleic Acids Res 11: 6089-6105.

Westbrock-Wadman, S., Sherman, D. R., Hickey, M. J., Coulter, S. N., Zhu, Y. Q., Warrenner, P., Nguyen, L. Y., Shawar, R. M., Folger, K. R., y Stover, C. K. (1999) Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* efflux pump contributing to aminoglycoside impermeability. Antimicrob Agents Chemother 43: 2975-2983.

Yang, K. W., y Crowder, M. W. (1999) Inhibition studies on the metallo-beta-lactamase L1 from *Stenotrophomonas maltophilia*. Arch Biochem Biophys 368: 1-6.

Yoneyama, H., Ocaktan, A., Tsuda, M., y Nakae, T. (1997) The role of mex-gene products in antibiotic extrusion in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem Biophys Res Commun* 233: 611-618.

Yoon, K. P., Misra, T. K., y Silver, S. (1991) Regulation of the cadA cadmium resistance determinant of *Staphylococcus aureus* plasmid pI258. *J Bacteriol* 173: 7643-7649.

Yoshida, H., Bogaki, M., Nakamura, S., Ubukata, K., y Konno, M. (1990) Nucleotide sequence and characterization of the *Staphylococcus aureus* norA gene, which confers resistance to quinolones. *J Bacteriol* 172: 6942-6949.

Zgurskaya, H. I., y Nikaido, H. (1999) Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7190-7195.

Zhang, L., Li, X. Z., y Poole, K. (2000) Multiple Antibiotic Resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: Involvement of a Multidrug Efflux System. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 287-293.

Ziha-Zarifi, I., Llanes, C., Kohler, T., Pechere, J. C., y Plesiat, P. (1999) In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 287-291.

Anexo I. Secuencia ERY1 de *S. maltophilia* D457R (Número de acceso EMBL: AJ251015).

```

1  GGATCCTGAT GATAATAGGG AGGTAGAACC ACCTAAAAAG GGATTTTGGA GTCGATTCTT
61  CGGTAATTAA AAATGAATGT AAAAGGTGTA TCAAGGGAGT ATAAATCTTT GATACACCTT
121 TTATAGTGAT GAAACTTCTG ATAATCATTC AGCATATGCG TTTATCAAAC GTCTCATTA
181 ACAATTTGGT AAACCTCAAA AGGTAATTAC AGATCAGGCA CCTTCAACGA AGGTAGCAAT
241 GGCTAAAGTC ATTAAAGCTT TTAAACTTAA ACCTGACTGT CATTGTACAT CGAAATATCT
301 GAATAACCTC ATTGAGCAAG ATCACCGTCA TATTAAAGTA AGAAAGACAA GGTATCAAAG
361 TATCAATACA GCAAAGAATA CTTTAAAAGG TATTGAATGT ATTTACGCTC TATATAAAAA
421 GAACCGCAGG TCTCTTCAGA TCTACGGATT TTCGCCATTG CCACGAAATT AGCATCATGC
481 TAGCAAGTTA AGCGAACACT GACATGATAA ATTAGTGGTT AGCTATATTT TTTACTTTGC
541 AATAGAACCT TTTAGGGGTA GGACTTTTCT TCAAATTGAA AAGCCCCCCT TGAATTGCGC
601 ACAGCGTGAC CTTACTATTC TGTTTTCTAC CTATTTATCC TTCACTCTCA TCAGTCGTAA
661 ACTATTTAAT GCTACCAAAA TAGTAGCTCC CATATCGGAA AGAATCGCTA TCCAAAGAGT
721 TAACCATCCC GGGATAACTA ATAGTAAGGC AATTATTTTA ATTCCGATAG CAAAAGTGAT
781 GTTAGCTTTA ATGATATTTA AAGTTTTTCG ACTGAGTCTT ACTGCAAATG GAAGCTTACT
841 TAAATCATCT CCCATTAATG CAATATCAGC TGTTTCAATT GCAGTATCCG TTCCAGCACC
901 GCCCATTGCA ATTCCAACAG TAGATGCAGC AAGTGCTGGA GCATCATTA CCGCATCGCC
961 AATCATAGCT ACATTATCAT ACTCTGATTG CATTTTTTTA ATATAATCTA ATTTATCCTG
1021 TGGCATCAAT TCAGACTGAA TATCAGAAAC GCCTACATGT GTACCGATTG CATTTGCAGT
1081 ACCTTGATTA TCACCTGTCA GCATAATTGT TTGCTTGATA CCTAACTGAT GAAGTTTTTG
1141 AATCACATTT TTA CTGTTT CACGAACCTC ATCTGCAACG GCAATTACGC CGAGAATTGT
1201 TTTTTCGGTT CCAATAATCA TGGCTGTTTT TCCTTGTTTT TGTAGGATTT TCACATTGTT
1261 TTCAAACCCA AGGCTAAAT CGGAAACATT TAATTCCTTG AAAAGTTTTG GGCTTCCAAT
1321 ATAGTAAGTA GTTCCGTTTA CAATCCCTTT TATACCTCGC CCAGTAATCG AAGTGAATTC
1381 TTCCACTTGT ACATTAGAAT AAGGGATATT ATCTTGCTCT GCCTTTTTCA TTATTGCTGA
1441 AGCAAGTGGA TGTTGTGAAC GATATTCTAA AGCTGTAATG GTAGAGAATA GCTCTTTTTC
1501 TTCCACTTGG TCATTTAATA CTTCAAATC TGTTACCACT GGTACACCTT TTGTCAGTGT
1561 TCCTGTTTTA TCAAATGCGA CTGTCTTAAT GTCTCCTAAT TTCTCGAGAT AGACACCACC
1621 TTTAACCAAC ACACCTTTTT TCGCTGCATT TCCAATTGCC GAGACAATCG AGATTGGAGT
1681 AGAAATAACT AATGCACAAG GACATCCAAC TACAAGAACT GCTAATCCTT GATAAACCCA
1741 TGTATCCCAA CTGCCACCAA AGAATAGGGG TGGAACGACT GCAACCAAGG CTGCAATAAC
1801 CATAATGATC GGAGTG TAGT ATTTGCAAAA TTTATCAACG AATGCTTGGG CTGGAGCACG
1861 CTCCCTTGT GCTTCTTCAA CAAGATGAAT AATCTTGGCA ATGGTTGTAT CTTCTACGTA
1921 TTTGGTGATT TTTACTTCAA TTAGTCCCTC TTCGTTAAGC GTACCTGCAA ATACTTCGTC
1981 ATCTACCGCT TTGGAGACGG GAACAGATTC TCCTGTTATA GCTGCCTCAT TGACAACCGA
2041 CAAGCCATTC ACAATGATTC CATCCATGGC AATTTTCTCC CCTGGTTTGA CAATCATGAT

```

2101 ATCACCACACA GCGATATCGT CCACATGGAT TATTATTTCC TGACCATTTT GTCTAACTAG
2161 TGCTTCTTTT GGGGCGATAT CCATCAATGA ACGTATGGAT TGTCTTGCTC TGTCCATAGA
2221 GAAGCGTTCA AGTGCTTCAC TGATTGCAAA GAGAATAACA ACAATAGATG CCTCTGCCCCA
2281 TTTACCAATA ATGGTAGCTC CAATAACAGC AACGGTTATC AAGGTTTTCA TGTGAAATC
2341 AAAGCGTATC AAATTTGGAA AACCAGCTTT AAATAATGAA TATCCGCCAA TTACAATAGA
2401 ACCTACAAAT AACATGGAAG TTACGAGGTT ATCTTCTCCA TTTACAAAGT GAGAAAGGTA
2461 ACCAAAAGCA ATTAGTAGTG TGGCAAACAG CAATGTACTA TGTTTTTTAT AAAATGGTGT
2521 TTTCTCTTCT TTATGAGCCT TAGTGTATC TTTAACCCTT TGTATCGTTT GATTCTGCTAG
2581 TTTTTCAGGA GATACTTTTA GATTCTCAA AGCACCTGCT TTTTCAAGTT CTTCACCGA
2641 TGCATTTCCA TATACATCAA TTTTAGAAGC GCCAAAGTTT ACTTTTGCCT CTGGAACGCC
2701 TGGAATCTTT TTAACATTTT TCTCAAACCT TCCTGCACAA TTTGCACATG TAAATCCTTG
2761 GACCCGATAG ACGTTCATTT CTTCTTCCAT TAGTTTAACC TTTTGTTTCA ACATTGACCT
2821 TCACTTCTTT CTTATGTGCT AGGGCGATCA TCATTATCTG CCCGATATGT TCATCATCTA
2881 AAGAATATAA AGCTAGTTTT CCTTCTTTTC TAAAGTTGAC CACCCCTTGC TTATAAAGCA
2941 TACGTAAATG ATGAGATGCA TTTGCTATCG TAACACCTAA GATATTTGCT ATATCACAAA
3001 CACACAACTC TTCATCCTGA CACAGAGCGT AAGTAATTTT TGCTCTATTT TCATCGGCAA
3061 TAGCCTTTAA CATTTGGCTA ACACCAGAAA TATCAACTGT TTGTAAATCC CCTTGTATTC
3121 GATTAACCTT TTCTTCGTCA TAACAAAAA TTTTACAAGT ATCTTTTTTT TTCATATTAT
3181 CATCCCATCT TCATTCAAAT ATTTATTTGA GTATACTATA ACCATTTTCG ACTCATCATA
3241 CAAGCAAATA TTTGAATGAA AATAAAAGAA GTAAGTAGGG CATAAAATTC TAGTCTCAAA
3301 AACGAACGTT ATTGAGAAAA AGAATATAGA AAAAAGAGAG AGCATATTTG CACTCTCTTT
3361 TCTTGTCTTT AAAAGCTCAT AATCGATTAT TATCATCCGT TTTGGGACGC TATGAGAAGC
3421 TCTCATTTAC ATCGAAGTAC AGTTTATTAA ATCAAGTCAT TATCGTGTTT AATTCTATAA
3481 ACAGTCTGTC TTGTTATATT CACTTCTTTC GCAATTTTAC TAATTGCTTG ACCTTCTTCC
3541 AACATCTCTA CAACTCTATG ATAAATAATA CGTTTTTGAG GATTTTTCGC ATTGGGCGAA
3601 TATAATAAAG GCGTCCTTT ATACACACCT TTTTCTTTCG CAATTTTAAT ACCTTGTCT
3661 TGTCTACGTT TACTTTCATT TCTTCTTGT TCTGAAACCA TTGCTAAAAT TTGGATGATT
3721 AAGCTTTTCA TAAATTTATC TAATAATGGG TTACCAATCA CTTCATTCAT CATAGGTAAA
3781 CTGGTAATCA TCAATTGAAT TTCTTTGTCT TTTAAATAAT TAACTGTGTT GATTACTTCA
3841 TCATAATTAC GTCCTAAACG ATCAATTGAC TCCACGACAA ACCGATCGCC CATTCTTACA
3901 AAATTAAGTG CTTCTTGCAA AATAGGTCTA TTTTCTACCG ACTTTCCTGA TTGTTTTTCT
3961 GTAAATATTT TTTCAACACC AAACGTTTTT AAATTTTCTA GTTGTCTTTC TAAATTTTGA
4021 TCAAGCGATG ATACCCTCGC ATAGCCAACA ATCATTGGTT CTCACCCATA ATTAACATAC
4081 ACCCTAATCA TACGTTTTAG TTGCTATAAA ATCAACAACA CTGTTTGATG GATTAGGGTG
4141 TACTCAAAGT GTACATATCT ATAATTAAAA CTTACTAAAA ATAAATATAG ATTTTTTCTT
4201 TGTAACAGAA CCGTTCATTT GAAGGTCATC TCTATCATAA ATATTTAAAT TAACTAAAAA
4261 TTTTAATCAT CTGTTTAATA CTTATGAAAT GTATTTACGG TAGGTATTAA AATTGATGAA
4321 ATTTATATAA GTGCTTTCAA TGAAAATGAC CGTTTATTTA TCCTCCTGAT TTAAGGAGTT

4381 AGAAATTTTCG AAAACGATTC TTTCCATTTG TTGCATTTGT TCCATGTCCA GATATTTAAT
 4441 ACATTATAGA AAACCAAAGA CCATCACTAA TTAAACGCAG TTTTAAAATT TCATCAGGAT
 4501 TGCCTTCGTC TTTAAATGG GCCTCTTTTA ATATAAGTTC TACTCTTTCA TACCTAACTC
 4561 TTTCAATGCC ATCGTTTCAT ACGCCGATTC TCCTGATTCC ATAGCAAACCT CAGCGATAAA
 4621 CATTGGGAAT ACTGCATTGA GTTCTATTAT ATGCTCTTTC ATTCGTGGCC ATATTTACAC
 4681 TCCAGCTTTA CCGTATGCTG TTATAAGTTG CTCTAATCCT TCGTCGTCGA ATACACGATG
 4741 GTGTCTCTATA AAGTCCATTG ATGGCTCGGA GTGGGTTGCT TCAGTCCAGT CTATGAGACC
 4801 TGTGACGTTT GCTTGGTTAT CTACCATTAT ATGTCCTGGA TGTAAGTCCC CATGTATCAT
 4861 GGTGCGCATGT CGAGGCCATA GTTCGTCGTT TTCTAACCAT TGTTTCCATC TGTTCCATAA
 4921 TTCATCTGAT ACGCCATAAG TTTCTTTAAC TTTATTCATT CTTCTTTGAA AGTCATTTTT
 4981 TATTTCTTGT ATGGTTTTGA TATTTATATG CTGAACGTTA ATGTTTTCTT CTGGTATGTT
 5041 GTGTAAATCT ACGAGTGTTT CAGCTAATGT GTTAATAAAG TTTTCTGGTA ATGGTTTGTG
 5101 TTCAATTTCC CATAATAAT TTTGTATTTT TGGATCTATT GTGGCTGCGG GTTTACCTGT
 5161 AAGTTTTGGG TAAGCAATAA GGTCTTTTGC ATGTACTTTC CACTTCGGTA TTTCAAATGA
 5221 AACATTCTTC TGTAAGAAGT CTACCGTTTG TTTTTCGGGT TTTGTTGTTT TATAAACGTC
 5281 AGGTCTTCTT GGTAGTCTCA AAACCCATTC TACTCCATGT TTATCTTTTC CAAATGCAAC
 5341 TTGAAAATCA AGTCCCGATT CATTCAATGA GATTGTTTGA GGTGGATGT GTAATTGATA
 5401 TTTTTCTGCA CATTTAATAA TTTCATTATG TCGAGTCATT TTATTGGATC C

Secuencias relevantes:

13-912: Gen homólogo a *mphBM*

Traducción:

MTRHNEIIKC AEKYQLHIQP QTISLNESSL DFQVAFGKDK HGVEWVLRRLP
 RRPDVYKRTK PEKQTVDFLQ KNVSFEIPKW KVHAKDLIAY PKLTGKPAAT
 IDPEIQNYVW EIEHKPLPEN FINTLAETLV DLHNIPEENI NVQHINIKTI
 QEIKNDFQRR MNKVKEYTGV SDELWNRWKQ WLENDELWPR HATMIHGDHL
 PGHIMVDNQA NVTGLIDWTE ATHSEPSMDF IGHHRVFDDE GLEQLITAYG
 KAGGEIWPRM KEHIIELNAV FPMFIAEFAM ESGESAYETM ALKELGMKE•

1397-2053: Gen homólogo a *bin3*

Traducción:

MIVGYARVSS LDQNLERQLE NLKTFGVEKI FTEKQSGKSV ENRPILQEAL
 NFVRMGDRFV VESIDRLGRN YDEVINTVNY LKDKEIQLMI TSLPMMNEVI
 GNPLLDKFMK SLIIQILAMV SEQERNESKR RQEQGIKIAK EKGVIKGRPL

LYSPNAKNPQ KRIIYHRVVE MLEEGQAISK IAKEVNITRQ TVYRIKHDND
LI•

2277-2645: Gen homólogo a *cadC*

Traducción:

MKKKDTCEIF CYDEEKVNRI QGDLQTVDIS GVSQMLKAIA DENRAKITYA
LCQDEELCVC DIANILGVTI ANASHHLRML YKQGVVNRK EGKLALYSLD
DEHIGQIMMI ALAHKKEVKV NV•

2638-4821: Gen homólogo a *cadA*

Traducción:

MSEQKVKLME EEMNVYRVQG FTCANCAGKF EKNVKKIPGV QDAKVNFGAS
KIDVYGNASV EELEKAGAFE NLKVSPEKLA NQTIQRVKDD TKAHKEEKT
FYKKHSTLLF ATLLIAFGYL SHFVNGEDNL VTSMLFVGS I VIGGYSLFKV
GFPNLIRFDF DMKTLITVAV IGATIIGKWA EASIVVILFA ISEALERFSM
DRARQSIRSL MDIAPKEALV RRNGQEIIH VDDIAVG DIM IVKPGEKIAM
DGIIVNGLSV VNEAAITGES VPSKAVDDE VFAGTLNEEG LIEVKITKYV
EDTTIAKIIH LVEEAQGERA PAQAFVDKFA KYTPIIMVI AALVAVVPPL
FFGGSWDTWV YQGLAVLVVG CPCALVISTP ISIVSAIGNA AKKGVLVKGG
VYLEKLGD I K TVAFDKTGTL TKGVPVVTDF EVLNDQVEEK ELFSITALE
YRSQHPLASA IMKKAEQDNI PYSNVQVEEF TSITGRGIK IVNGTTYIIG
SPKLFKELNV SDFSLGFENN VKILQNQGKT AMIIGTEKTI LGVIAVADEV
RETSKNVIQK LHQLGIKQTI MLTGDNQGTA NAIGTHVGVS DIQSELMPQD
KLDYIKMQS EYDNVAMIGD GVNDAPALAA STVGIAMGGA GTDTA I ETAD
IALMGDDL SK LPFAVRLSRK TLNIIKANIT FAIGIKI I AL LLVIPGWLT L
WIAILSDMGA TILVALNSLR LMRVKDK•

4989-5318 (hebra complementaria): Fragmento del gen homólogo a *tnpA*

Traducción:

YTFYSDETS D NHSAYAFIKR LIKQFGKPQK VITDQAPSTK VAMAKVIKAF
KLKPDCHCTS KYLNNLIEQD HRHIKVRKTR YQSINTAKNT LKGIECIYAL
YKKNRRSLQI YGFSPLPRN•

Anexo II: Secuencia *smeDEF* de *S. maltophilia* D457R (Número de acceso EMBL: AJ252200).

```

1 ATCTGCGGGC TTTCACCGGA AGGGGAATGT CCATCGATAT CAGCTCCCTC TGAGATTCCT
61 TCCTCCAAGA GCCTTTCCGT CATGTTGCTG AGCCGAATCC GACCCTTTGC ACTGTCGCTG
121 GCAATCGCCG CGACCGTGGC TGCCTGCGGC GGCCAACCCC AGGCCCCCGA GCAGGGCCCCG
181 GGTGACGTCA CCGTGGTCAC GCTGAAGTCC GAGACCGTGG GCCTGACCCG CGAACTGCCC
241 GGCCGTACCA ATGCCTTCCT GGTGCGCCGAA GTGCGCCCGC AGGTCAATGG CATCGTGGCC
301 AAGCGCCTGT TTACCGAGGG CGGCATGGTC AAGGCCGGCG AGCCGCTGTA CCAGCTCGAC
361 GATGCCAGCT ACCGGGCCCCA GGCCAACAAC GCCC CGCGCC AGCTGGCCCC CGCCGAAGCC
421 ACCGCCAATG CCGCGCGCCT GAGTGCCAAG CGCATCACCG AGCTGGCCAA GTTCGATGCG
481 GTCAGCCAGC AGGACCTGGA GAACGCCGTC GCCGCGCAGA AGCAGGCCGA GGCCGACGTC
541 GGTGCCGCCA AGGCCTCGCT GGATGCGGCC AACGTCACCC TGGGCTACGC CCGCATCACC
601 GCGCCGATCA GCGGCCGCAT CGGCAAGTCC AGCGTCACCC AGGGTGCGCT GTTCAGCGCC
661 GGCCAGGCCA ACGCACTGGC CACCGTGCAG CAGCTGGACC CGATCTATGT CGACCTGACC
721 CAGTCCTCGG CCGAGCTGCT GCAGCTGCGC CGCGAACTGG CCGCCGGCCG CCTGCAGGAC
781 AACCAGACCC TGCCGGTCAG CATCCTGATG GAAGACGGCA GCACCTTCGA GCACAAGGGC
841 ACTCTGGAGT TCTCCGAAGT CAGCGTTGAT CCGACCACCG GCAGCTTCGG CCTGCGCGTG
901 AAGGTGGACA ACCCGGACGG CCTGCTGATG CCGGGCATGT ACGTGCGTGC GGTGATCGGC
961 GGCGGCGTGC GCAGCGACGC GGTGCTGGTG CCGATGCAGG GCATCGCGCG CGATCCGAAG
1021 GGCGACACCA CCGCGATGGT GGTGCGCAAG GACAACAAGG TCGAAGTGCG CCCGGTCAAG
1081 GTCAGCCGCA CGGTGCGCGA CAAGTGGCTG GTCGAGGACG GCCTGAAGGC CGGTGACAAG
1141 GTCATCGTCG AAGGCCTGCA GAAGATCGGC CCCGGCATGC CGGTCAAGGC CACCGAGAAG
1201 GGCGACGCAC CGGCCAAGCC GGCGGCAGCC GCCCAGCCTG CCGCCCCGGC CGGCGACCGC
1261 AAGTAAGCGG AGAACCCCAT GGCACGCTTT TTCATCGATC GACCCATCTT TCGTGGGTG
1321 ATCGCCATCA TCATCATGCT CGCCGGCGGC CTGGCGCTGT TCAAGCTGCC GGTCTCGATG
1381 TACCCCAACG TCGCACC GCCGCTGGAA ATCAGCGCCA CCTACCCGGG TGCATCGGCC
1441 AAGGTGGTCG AGGACTCGGT GACGAGATC ATCGAGCAGA ACATGAAGGG CCTTGATGGC
1501 CTGATCTACT TCTCCTCCAA CAGCTCGTCC AACGGCCAGG CCACCATCAC CCTGACCTTC
1561 GAGAGCGGCA CCAACCCGGA TATCGCCAG GTGCAGGTGC AGAACAAGCT GCAGCTGGCC
1621 ATGCCGCTGC TGCCGCAGGA AGTGCAGCGG CAGGGCATCA ACGTGGCCAA GTCCAGCTCG
1681 GGCTTCTCTGA ACGCCATCGC GTTCGTGTCC GAGAACGGCA GCATGGACGC CAACGACATC
1741 GCCGACTACG TCGGTTCCAA TGTCGTCGAC CGCCTGAGCC GCGTGCCGGG CGTGGGCAAC
1801 ATCCAGGTGT TCGGTGGCAA GTACGCCATG CGCATCTGGC TGGACCCGAA CAAGCTGCAT
1861 ACCTATGGCC TGTCGGTGCC GGAAGTGACC GCCGCGATCA AGGCGCAGAA CGCCCAGGTG
1921 GCGATCGGCC AGCTCGGCGG TGCGCCGTCG GTGAAGGGCC AGCAGCTCAA CGCCACCATC
1981 AACGCGCAGT CGCGCCTGCA GACCCCGGAA CAGTTCCGAA ACATCATCGT GCGCGGTGCG
2041 CAGGACGGTG CCGAGCTGCG CCTGGGTGAT GTCGCCCCGCG TCGAGCTGGG TGCCGAGTCC
2101 TACGACTTCG TCACCCGCTA CAACGGCCAG CCGGCCAGTG GCCTGGCGGT CACCCTGGCC
2161 ACCGGCGCCA ACGCGCTGGA TACCGCGGCC GGTGTGGATG CCGCGCTGGA AGACATGAAG
2221 GGCTTCTTCC CGGCGGCGCT GAAGGCCGAG ATCCCGTACG ACACCACCCC GTTCGTGCGC
2281 GTGTCGATCA AGGGCGTGGT GCAGACCCTG ATCGAAGCGA TCGTGCTGGT GTTCGTGGTG

```


2341 ATGTACCTGT TCCTGCAGAA CTTCCGCGCC ACGCTGATCC CGACCATCGC CGTGCCCGGTG
2401 GTGCTGCTGG GTACCTTCGG CGTGCTGGCG ATGCTGGGCT TCTCGGTGAA CATGCTGACC
2461 ATGTTTCGCGA TGGTGCTGGC GATCGGCCTG CTGGTGGACG ATGCCATCGT GGTGGTGGAG
2521 AACGTCGAGC GCATCATGTC CGAGGAAGGG CTGTCGCCGC TCGAAGCGAC CCGCAAGTCG
2581 ATGGGCCAGA TCACCGGTGC GCTGGTGGGT ATCGGCCTGG TGCTGTCCGC GGTGTTTCGTG
2641 CCGATGGCCT TCATGAGCGG CTCCACCGGC GTGATCTATC GCCAGTTCTC GGCCACGATT
2701 GTCTCTGCGA TGGCGTTGTC GGTGCTGGTG GCGATCGTGC TGACCCCGGC ACTGTGCGCG
2761 ACCATGCTCA AGCCGCTGAA GAAGGGTGAG CACCACGTCG CCCACCGTGG CCTGGCCGGT
2821 CGCTTCTTCA ATGGCTTCAA CCGTGGCTTC GATCGCACCA GCGAAAGCTA CCAGCGCGGC
2881 GTGCGCGGCA TCATCCACCG TCCGTGGCGC TTCATGGGCA TCGTGGCGGC CTTGTTTCGTG
2941 CTGATGGGCG TGCTGTTCTG GCGCCTGCCC AGCTCGTTCC TGCCCAACGA AGACCAGGGT
3001 GTGCTGATGG CGCTGGTGCA GCGCGCCGTC GGTGCCACCC AGGAACGCAC GCTGGAATCG
3061 ATCGCGGCAC TGGAAAACCA CTTCTGTCAG AACGAGAAGG ATGCGGTGGA CTCGGTGTTC
3121 TCCGTGCAGG GCTTCAGCTT CGCCGCGATG GGCCAGAACG CGGGCATGGC GTTCGTCAAG
3181 CTGAAGGACT GGAGCGAGCG TGACGCCGAC AATGGCGTGA TGCCGATCAC CGGACGTGCG
3241 ATGGCGGCCC TGGGCCAGAT CAAGGATGCC TTCATCTTCG CCTTCCCGCC GCCGGCCATT
3301 CCGGAGCTGG GGACCGCCTC GGGCTACACC TTCTTCCTGA AGGACAACAG CGGCCAGGGC
3361 CACGAGGCAC TGGTGGCCGC GCGCAACCAG CTGCTCGGCC TGGCCGCAGG CAGCAAGAAG
3421 CTGGCCAACG TACGCCCCGA CGGCCAGGAA GACACGCCGC AGTTCCGCAT CGACATCGAC
3481 GCGGCCAAGC CGACCTCGCT GGGACTGTCT ATCGACCAGA TCAACGGCAC GCTGGCGGCC
3541 GCGTGGGGCA GCTCGTACAT CGATGACTTC GTCGATCGTG GCCGCGTCAA GCGCGTGTTC
3601 GTGCAGGCCG ACCAGGCGTT CCGCATGGTG CCGGAGGACT TCGATCTCTG GTCCGTGAAG
3661 AACGACAAGG GTGAGATGGT GCCGTTACGC GCCTTCGCTA CCAAGCACTG GGACTACGGT
3721 TCGCCGCGCC TGGAACGCTA CAACGGTGTG TCGGCAATGG AAATCCAGGG CGAACC GGCC
3781 CCGGTGTCTG CCTCCGGTGA TGCCATGGCC GAGATCGAAC AGCTGGCCAA GCAGCTGCCG
3841 GCGGTTTTCG GCATCGAATG GACGCGCATG TCCTACCAGG AACGCCAGGC CGGCTCGCAG
3901 ACGCCGCTGC TGTACACGCT GTCGCTGATG ATCGTGTTC TGTGCCTGGC CGCGATGTAT
3961 GAAAGCTGGA GCGTACCGAC CGCGGTGCTG CTGGCGGCCC CGCTGGGTAT CCTCGGCGCG
4021 GTGCTGGCCA ACACCTTCAA GGGCCTGGAG CGCGACATCT ACTTCCAGGT GGCGATGCTG
4081 ACCACGGTGG GCCTGACCAG CAAGAACGCG ATCCTGATCG TCGAGTTCGC CAAGGAAAAC
4141 CTGGAAAAGG GCGCCAGCCT GATCGAGTCG ATCATGCACG CCGTGCGCGA CCGCCTGCGC
4201 CCGATCGTGA TGACCTCGCT CGCCTTCGGC ATGGGCGTGG TACCGCTGGC GATCTCCACC
4261 GGTGCCGGCT CCGGCGCCAA GCAGGCGATC GGCACCGGCG TGCTCGGCGG CATGATCGTC
4321 GGCACCGTGC TCGGCGTGTT CTTCTGTCCG CTGTTCTTCG TGGTGGTGCA GCGCGTGTTC
4381 AAGCGCAGAT CCACGACGTG ACCTGAAACG GTCATGCCGG CCTCAGGCTG GCGTTATCGA
4441 AACGGTAGTG CCGGCCGCTG GCCGGCACTG CCTCCTGCCA TCCGGCAGTA CCGATGGAAG
4501 TGATCCCCAT GAAAAGTGCA TCCCTGTTCC TCTCCATTGC CGCCACGCTC GCGCTGGCCG
4561 GCTGCTCCAC CCTGGCGCCG AAGAACACCG CCGTCGCTCC GGCGATTCCCT GCGCAGTGGC
4621 CGGCCGAGGC CGCGCAGGGC GAGGTGGCCG ATGTCGCCGC CGTCGGCTGG CGCGATTTCCT
4681 TCACCGATGC GCGCCTGCAG CAGGTGATCG AGCAGTCGCT GCAGAACAAC CGCGACCTGC
4741 GCGTGGCCGT GCTCAATGTC GAGCGCGCGC GTGGCCAGTA CCGCGTGCAG CGCGCCGATC
4801 GCGTGCCCGG CGTGGCCGTG ACCGGCCAGA TGGACCGCCG TGGTACCGAT GCCGGTGTCA

4861 CCGAGCAGTT CAGCGCGGGC GTGGGTGTGG CCGAGTTCGA GCTGGACCTG TTCGGTCGCG
4921 TGCGCAACCT CAGCGAGGCG GCGCTGCAGC AGTACTTCGC CGTGGCTGCC AACCGCCGCA
4981 ACGCGCAGCT GAGCCTGGTG GCCGAGACCG CCACCGCGTG GCTGACCTAT GGGGCTGATG
5041 CGCAGCGGCT GAAGATCGCC GATGCCACGC TGAAGACCTA CGAGGATTCG CTGCGCTTGG
5101 CCGAGGCCCG CCACGAACGC GGCGGCAGTT CGGCGCTGGA GCTGACCCAG ACCCGTACCT
5161 TGGTCGAGAC CGCACGCACC GATGCCGCGC GCCTGCGCGG CCAGCTGGCC CAGGACCGCA
5221 ACGCACTGGC GCTGCTGGCC GGTGGCCAGC TCGATCCGGC ACTGCTGCCG GACAGCATCG
5281 AACCGCAGCT GCTGGCGCTG GCCCCGCCGC CGGCCGGCCT GCCACGCGAC GTGCTGCTGC
5341 AGCGCCCGGA CATCATGGCC GCCGAACACC AGCTGCTGGC CGCCAATGCC AACATCGGTG
5401 CGGCACGCGC AGCGTTCTTC CCGAGCATCT CGCTGACCGG CAGCATCGGC AGCGGCTCCA
5461 GCGAACTGTC CAACCTGTTC GACAGCGGCA CCCGTGTGTG GAGCTTCCTG CCGAAGATCA
5521 CCCTGCCGAT CTTCCAGGGC GGCAAGCTGC GCGCCAACCT GGCCATCGCC AACGCGGATC
5581 GTGATATCGC ACTGGCGCAG TACGAGAAGT CGATCCAGGT GGGATTCCGC GAAACGGCCG
5641 ATGCGCTGGC GTTGAATGTC AGCCTGGATG AGCAGGTGAG TTCACAGCAG CGCCTGGTGG
5701 AAGCGGCCGA ACAGGCCAAT CGCCTGTGCG AGGCACGCTA CGACGCGGGG CTGGACAGCT
5761 TTGTCACCCT GCTTGACGCG CGGCGTACCG CCTACAACGC GCAGCAGACC CAGCTGCAGG
5821 CGCAGTTGGC GCAGCAGGCC AACCGCATCA CCCTGTACAA GGTGCTGGGC GGCGGCTGGC
5881 ACGAGCGCGG GTAAGCAGTG CTTCTGGTAG GTGC

82-1266: *smeD*

Traducción:

MLLSRIRPFA LSLAIAATVA ACGGQPQAPE QGPGDVTVVV LKSETVGLTR
ELPGRTNAFL VAEVRPQVNG IVAKRLFTEG GMVKAGEPLY QLDDASYRAQ
ANNARAQLAR AEATANAARL SAKRITELAK VDAVSQQDLE NAVAQKQAE
ADVGAAKASL DAANVTLGYA RITAPISGRI GKSSVTQ GAL VSAGQANALA
TVQQLDPIYV DLTQSSAELL QLRRELAAGR LQDNQTL PVS ILMEDGSTFE
HKGTLEFSEV SVDPTTGSFG LRVKVDNPDG LLMPGMYVRA VIGGGVRSDA
VLVPMQGIAR DPKGDTTAMV VGKDNKVEVR PVKVSRTVGD KWLVEDGLKA
GDKVIVEGLQ KIGPGMPVKA TEKGDAPAKP AAAAQPAAPA GDAK•

1279-4401: *smeE*

Traducción:

MARFFIDRPI FAWVIAIIIM LAGGLALFKL PVSMPNVAP PAVEISATYP
GASAKVVEDS VTQIIEQNMK GLDGLIYFSS NSSSNGQATI TLT FESGTNP
DIAQVQVQNK LQLAMPLLPQ EVQRQGINVA KSSSGFLNAI AFVSENGSMD
ANDIADYVGS NVVDRLSRVP GVGNIQVFGG KYAMRIWLDP NKLHTYGLSV
PEVTAAIKAQ NAQVAIGQLG GAPSVKGQQL NATINAQSRL QTPEQFRNII
VRGAQDGAEL RLGDVARVEL GAESYDFVTR YNGQPASGLA VTLATGANAL

DTAAGVDAAL EDMKGFFPAG LKAEIPYDTT PFVRVSIKGV VQTLIEAIVL
VFVVMYLFLO NFRATLIPTI AVPVVLLGTF GVLAMLGFSV NMLTMFAMVL
AIGLLVDDAI VVENVERIM SEEGLSPLEA TRKSMGQITG ALVGIGLVLS
AVFVPMAFMS GSTGVIYRQF SATIVSAMAL SVLVAIVLTP ALCATMLKPL
KKGEHHVAHR GLAGRFFNGF NRGFDRTSES YQRGVIRGIIH RPWRFMGIVA
ALFVLMGVLF VRLPSSFLPN EDQGVLMALV QAPVGATQER TLESIAALEN
HFLQNEKDAV DSVFSVQGF S FAGMGQNAGM AFVKLKDSE RDADNGVMPI
TGRAMAALGQ IKDAFIFAFP PPAIPELGTA SGYTFFLKDN SGQGHEALVA
ARNQLLGLAA GSKKLANVRP NGQEDTPQFR IDIDAAKATS LGLSIDQING
TLAAAWGSSY IDDFVDRGRV KRVFVQADQA FRMPEDFDL WSVKNDKGEM
VPFSAFATKH WDYGSPRLER YNGVSAMEIQ GEPAPGVASG DAMAEIEQLA
KQLPAGFGIE WTAMSYQERQ AGSQTPLLYT LSLMIVFLCL AAMYESWSVP
TAVLLAAPLG ILGAVLANTF KGLERDIYFQ VAMLTTVGLT SKNAILIVEF
AKENLEKGAS LIESIMHAVR DRLRPIVMTS LAFGMGVVPL AISTGAGSGA
KQAIGTGVLG GMIVGTVLGV FFFVPLFFVVV QRVFKRRSTT •

4494-5894: *smeF*

Traducción:

MEVIPMKSAS LFLSIAATLA LAGCSTLAPK NTAVAPAIPA QWPAAEAQGE
VADVAAVGWR DFFTDARLQQ VIEQSLQNNR DLRVAVLNVE RARGQYRVQR
ADRVPGVAVT GQMDRRGTDA GVTEQFSAGV GVAEFELDLF GRVRNLSEAA
LQQYFAVAAN RRNAQLSLVA ETATAWLTYG ADAQRLKIAD ATLKTYEDSL
RLAEARHERG GSSALELTQT RTLIVETARD AARLRGQLAQ DRNALALLAG
GQLDPALLPD SIEPQLLALA PPPAGLPSDV LLQRPDIMAA EHQLLAANAN
IGAARAAFFP SISLTGSIGS GSSELSNLFD SGTRVWSFLP KITLPIFQGG
KLRANLAIAN ADRDIALAQY EKSIQVGFRE TADALALNVS LDEQVSSQQR
LVEAAEQANR LSQARYDAGL DSFVTLLDAR RTAYNAQQTQ LQAQLAQGAN
RITLYKVLGG GWHEREG •

Anexo III: Secuencia *smeT* de *S. maltophilia* D457R.

```
1 CATGACGGAA AGGCTCTTGG AGGAAGGAAT CTCAGAGGGA GCTGATATCG ATGGACATTC
61 CCCTTCCGGT GAAAGCCCGC AGATCGCGCC CACCCGGGTG GAGTGGGCGC CGGACCGGCC
121 TGCCACGCAC ACGACGGGAA TGATGGGTGC GAAATATACA TACATGCTTG TTTGTTTGTA
181 AACCGGTACA ATTCAGCCAC GTTTCACCCG CACTCGTACC CACACCCATG GCCCGCAAGA
241 CCAAAGAGGA CACCCAGGCA ACCCGGGAAG GCATCCTTGA CGCCGCCGAA GCCTGCTTCC
301 ATGAACACGG CGTGGCCCGT ACCACGCTGG AGATGATCGG TGCCCGCGCC GGCTACACCC
361 GTGGCGCGGT CTACTGGCAC TTCAAGAACA AGAGCGAGGT GCTGGCCGCC ATCGTCGAGC
421 GCGTGACCTT GCCCTTCATG CAGGAAGTGG AGCGCACCTC CACCGACCAG CGCGACACCC
481 CGGTGCACGA CCTGCGCGCG GTGATGATCC ACTCGTTCAT CGAGCTGTCC GAGGACGAGC
541 GCCTGCGCAA GACCATGGAG ATCATGCTGC GCAGCGATGC GTCGGCGAAC ACCAGGGTGC
601 TGACCGAAAT GCAGCAGGCC GGATTCCGCG ATGCGCTGGA CCGGATGGAG CGTGCCCTGC
661 GCCGCGCCCG CGATCTGGGC CAGCTGCGCG AAGGCGCCGA CCCGAAAATC GCCGCGCGCA
721 TGCAGCACGC CACCGTGCTG GCGTGCTGC ACGGCGCGAT GGTCGAACCG GAACTGATGG
781 ACCTCAAGCG CGATGGCATG CTCGCGCTGG ACATGACCCT GGCCGCCTAC GTGAAGGATG
841 GTGTGTTTCT TCCCGGCACC GTCCCCGAGC CGCTGCCCCA GGCGTGAACG AGGCTGCTCC
901 CATCACTGCG GCACCCCTTG CAAGGGCAGA TCGATGATCC TGGACAACGT GGTGTGGGGC
961 TTCATCGGGT GTGGCAGCGT CACCGAGAAG AAGAGCGGGC CAGCCCTGGC CAACACGCCC
1021 GGCTCACGGG TAGTGGCGGT CATGCGCCGC AATGCCGCAT TGGCCGAAGA CTATGCACGC
1081 CGCCACGCGA TTCCGCGCTG GTACGCGGAC GCCGATGCAC TCATCGCCGA TCCGAGGTG
1141 AACGCGGTCT ACGTTGCAAC ACCGCCCTCC ACGCACATGC ACTACGCATT GCA
```

228-887: *smeT*

Traducción:

```
MARKTKEDTQ ATREGILDAA EACFHEHGVA RTTLEMIGAR AGYTRGAVYW
HFKNKSEVLA AIVERVHLPF MQELERTSTD QRDTPVHDLR AVMIHSFIEL
SEDERLRKTM EIMLRSDASA NTRVLTEMQQ AGFRDALDRM ERALRRARDL
GQLREGADPK IAARMQHATV LGVLHGAMVE PELMDLKR DG MLALDMTLAA
YVKDGVFVPG TVPEPLPEA•
```